

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

IVANA Lj. ZEKOVIĆ

**KOMPARATIVNA ANALIZA
PIGMENTNIH LEZIJA I ZDRAVOG TKIVA
KOŽE OPTIČKIM SPEKTROSKOPSKIM
METODAMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

IVANA Lj. ZEKOVIĆ

**COMPARATIVE ANALYSIS OF
PIGMENTED SKIN LESIONS AND
NORMAL SKIN USING OPTICAL
SPECTROSCOPIC METHODS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Članovi komisije

1. *Prof. Dr Siniša Đurašević,*

vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

2. *Dr Tatjana Dramićanin*

viši naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke Vinča.

3. *Prof. Dr Miroslav D. Dramićanin,*

naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke Vinča,

redovni profesor Fizičkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Datum odbrane doktorata _____

(dan, mesec, godina)

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za radijacionu hemiju i fiziku Instituta za nuklearna nauke „Vinča“ u saradnji sa Institutom za ortopedsko-hirurške bolesti „Banjica“ u Beogradu pod rukovodstvom prof. dr Miroslava Dramićanina, dr Tatjane Dramićanin i prof. dr Siniše Đuraševića.

Iskreno se zahvaljujem prof. dr Miroslavu Dramićaninu na velikoj pomoći i nesebičnoj podršci i strpljenju, kao i velikom doprinosu svojim idejama i sugestijama tokom realizacije doktorske disertacije u svim njenim fazama.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Tatjani Dramićanin na ogromnoj pomoći tokom eksperimentalnog rada i pisanja ove disertacije, kao i razumevanju, podršci i korisnim savetima i sugestijama.

Prof. dr Siniši Đuraševiću se iskreno zahvaljujem na saradnji tokom osnovnih i doktorskih studija, korisnim savetima i učešću u procesu realizacije disertacije.

Posebno se zahvaljujem prof. dr Gordani Cvijić na pomoći i korisnim sugestijama tokom osnovnih i doktorskih studija.

Zahvaljujem se Dr. sci med. Vojislavu Raspopoviću i Prim. Dr. Jadranu Bandiću na stručnoj pomoći i korisnim savetima tokom eksperimentalnog rada.

Veliku zahvalnost dugujem Lei Lenhardt na podršci i razumevanju, stručnoj pomoći i iskrenim savetima, kao i divnoj saradnji tokom eksperimentalnog rada i pisanja disertacije.

Dr Željki Antić, dr Vesni Đorđević, Sanji Čulubrk, Bojani Milićević i svim kolegama i koleginicama iz laboratorije se najtoplije zahvaljujem na pozitivnom stavu i velikoj podršci i pomoći, što mi je svakodnevni rad učinilo lepšim i lakšim.

Svojoj porodici i Banetu sam zahvalna na bezgraničnoj podršci i ljubavi koja mi je dala oslonac da istrajem u svom radu.

Ivana Zeković

KOMPARATIVNA ANALIZA PIGMENTNIH LEZIJA I ZDRAVOG TKIVA KOŽE OPTIČKIM SPEKTROSKOPSKIM METODAMA

Rezime

Optička spektroskopija i imidžing tehnike mogu biti korisne za ranu dijagnostiku kancera. U ovoj tezi, razlike u luminescentnim odgovorima pigmentnih lezija (melanoma i nevusa) i po svemu sudeći nepigmentne kože ljudi su analizirane sinhronom luminescentnom spektroskopijom. Merenja su izvršena u opsegu eksitacione talasne dužine od 330 do 545 nm i sinhronom intervalu od 30 do 120 nm, da bi se dobili osnovni i trodimenzionalni sinhroni luminescentni spektri (3DTSLS) za svaki uzorak. Normalna koža, nevus i melanom se razlikuju u načinu na koji fluoresciraju, i te razlike su više naglašene u sinhronim fluorescentnim spektrima nego u klasičnim emisionim i eksitacionim spektrima. Razlike u fluorescentnim karakteristikama pigmentnih lezija i zdrave kože potiču od različitih koncentracija endogenih fluorofora i hromofora. Analizom glavnih komponenata i linearnom diskriminantnom analizom sinhronih spektara izmerenih za različite sinhronne intervale pokazano je da je najveća razlika između grupa uzoraka dobijena za sinhroni interval 70 nm. Ovi spektri su zatim korišćeni za pravljenje klasifikacionih modela diskriminantnom analizom parcijalno najmanjih kvadrata. Testiranjem uspešnosti ovih modela krivom operativnih karakteristika pokazano je da su oni optimalni, sa maksimalnom vrednošću od jedan za površinu ispod krive operativnih karakteristika za detekciju melanoma. Za testiranje primenjivosti pomenutih tehnika korišćene su veštačke neuronske mreže. U ovu svrhu, samoorganizujuće mape (SOM) i višeslojni perceptron (MLP) su obučene na osnovu luminescentnih podataka, a zatim je izvršeno grupisanje uzoraka tkiva. Pokazano je da su obe mreže SOM i MLP dale dobre rezultate sa stopom uspešnosti klasifikacije uzoraka tkiva od 96% i 98%. Drugi deo eksperimentalnog rada u ovoj tezi se sastojao od merenja difuzno refleksionih spektara kože volontera na dve regije tela, čelu i šaci, u cilju analize svojstava boje kože na objektivan način. Dobijeni spektri su analizirani korišćenjem analize glavnih komponenata (PCA) i $L^*a^*b^*$ sistema boja koji je preporučen od Međunarodne komisije za osvetljenje (CIE). Na osnovu rezultata analiza pokazano je da difuzno refleksiona spektroskopija uz korišćenje analize glavnih

komponentata i $L^*a^*b^*$ sistema boja predstavlja korisnu i objektivnu metodologiju za analiziranje karakteristika kože.

Ključne reči: koža, pigmentne lezije, sinhrona luminescentna spektroskopija, veštačke neuronske mreže, difuzno refleksiona spektroskopija

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Eksperimentalna biomedicina

UDK broj: 577.336: 616.5-006 (043.3)

COMPARATIVE ANALYSIS OF PIGMENTED SKIN LESIONS AND NORMAL SKIN USING OPTICAL SPECTROSCOPIC METHODS

Abstract

Novel optical spectroscopy and imaging methods could be valuable in the early detection of cancer. Differences in the luminescence responses of pigmented skin lesions (melanomas and nevi) and apparently non-pigmented human skin were analyzed using synchronous luminescence spectroscopy in this thesis. Measurements were performed in the excitation range of 330-545 nm, with synchronous interval varying from 30-120 nm to obtain ordinary and three-dimensional total synchronous luminescence spectra (3DTSLs) of each specimen. Normal skin, nevi and melanomas differ in the way they fluoresce, and these differences are more distinct in the synchronous fluorescence spectra than in the conventional emission and excitation spectra. The differences in the fluorescence characteristics of pigmented and normal skin samples were ascribed to differences in concentrations of endogenous fluorophores and chromophores. Principal component and linear discriminant analysis of the synchronous spectra measured at different synchronous intervals showed that the greatest variance among the sample groups was at the 70 nm interval spectra. These spectra were then used to create partial least squares discriminant analysis-based classification models. Evaluation of the quality of these models from the receiver operating characteristic curves showed they performed well, with a maximum value of one for the area under the curve for melanoma detection. To test applicability of the presented techniques artificial neural networks were used. For this purpose self organizing maps (SOM) and multi layer feed-forward neural network (MLP) were trained with luminescence data and then used for tissue specimen clustering. It was shown that both SOM and MLP gave promising results with 96 to 98% success tissue classification rate. Second part of experimental work in this thesis were measurements of diffuse reflectance spectra from skin sites located on a forehead and top of a hand of healthy volunteers in order to analyze skin color properties in an objective way. Obtained spectra were analyzed using principal component analysis (PCA) and standard Commission International d'Eclairage (CIE) $L^*a^*b^*$ color scheme. Based on results of analysis it was shown that diffuse reflectance spectroscopy combined with the PCA and

the L*a*b* color system is a convenient and objective methodology for analyzing skin properties.

Key words: skin, pigmented lesions, synchronous luminescence spectroscopy, artificial neural networks, diffuse reflectance spectroscopy

Scientific field: Biology

Major in: Applied Biomedicine

UDC number: 577.336: 616.5-006 (043.3)

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 Građa, funkcija i klasifikacija kože	1
1.2 Fototipovi kože	3
1.3 Kanceri i pigmentne lezije kože.....	6
1.4 Pigmentne lezije kože	9
1.5 Histološka klasifikacija melanoma.....	11
1.6 Kliničko dijagnostikovanje kancera kože.....	13
1.7 Optičke osobine tkiva.....	17
1.8 Luminescencija	19
1.8.1 Fotoluminescencija.....	21
1.8.2 Fosforescencija	22
1.9 Fluorescentni spektrometar	23
1.10 Luminescentne spektroskopske tehnike	24
1.11 Fluorofore.....	26
1.12 Optičke spektroskopske tehnike-difuzna refleksija.....	29
1.13 Primena optičkih spektroskopskih metoda u biomedicinskoj dijagnostici.....	30
2. CILJEVI.....	33
3. MATERIJAL I METODE	34
3.1 Priprema uzorka	34
3.2 Merenje sinhronne luminescencije.....	35
3.2.1 Sinhroni luminescentni spektri	36
3.3 Merenja difuzne refleksije kože.....	38
3.3.1 Difuzno-refleksioni spektri kože	39
3.4 Multivarijantna analiza podataka	40
3.5 Eksploratorna analiza podataka	41
3.5.1 Analiza glavnih komponenata.....	42
3.6 Klasifikacija	44
3.6.1 Linearna diskriminantna analiza.....	45
3.6.2 Diskriminantna analiza parcijalno najmanjih kvadrata.....	46
3.6.3 Metoda potpornih vektora	47
3.6.4 Veštačke neuronske mreže	48
3.7 $L^*a^*b^*$ sistem za određivanje boje kože.....	51
4. REZULTATI.....	53
4.1 Sinhrona luminescentna spektroskopija	54
4.1.1 Trodimenzionalni sinhroni luminescentni spektri	54
4.1.2 Sinhroni luminescentni spektri	57

4.2 Selekcija sinhronih spektara analizom glavnih komponenata i linearnom diskriminantnom analizom	58
4.3 Klasifikacija lezija kože diskriminantnom analizom parcijalno najmanjih kvadrata.....	61
4.3.1 Evaluacija PLS-DA modela-kriva operativnih karakteristika (ROC)	63
4.4 Klasifikacija podataka veštačkim neuronskim mrežama	66
4.4.1 Klasifikacija podataka dobijenih iz 3DSL spektara samoorganizujućom neuronskom mrežom.....	66
4.4.2 Klasifikacija podataka dobijenih iz 3DSL spektara metodom višeslojnog perceptrona	68
4.5 Klasifikacija podataka dobijenih iz 3DSL spektara metodom potpunih vektora	69
4.6 Difuzna refleksija kože.....	70
4.7 Određivanje boje kože L*a*b* sistemom.....	72
 5. DISKUSIJA	 74
6. ZAKLJUČAK	81
7. LITERATURA.....	83
8. BIOGRAFIJA	91
9. PRILOG	93

1. UVOD

Tumori kože pripadaju grupi najčešćih malignih oboljenja ljudske populacije kako kod nas tako i u svetu. Po učestalosti, u razvijenim zemljama Zapada, melanom je maligni tumor s najbržim uvećanjem broja obolelih i njegova incidencija približno se udvostručuje skoro svakih 10 godina. Procenjuje se da broj novonastalih melanoma čini 5% svih malignih tumora kože, skoro 2% svih vrsta tumora kože i da predstavlja 1–2% smrtnih slučajeva od svih malignih bolesti. Kada se dijagnostikuje u početnoj fazi nastanka moguće je potpuno izlečenje. Ovi podaci motivisali su veliki broj naučnika iz različitih oblasti istraživanja da ujedine svoja znanja u cilju pronalaženja leka i razvijanja tehnika za ranu dijagnostiku ove teške bolesti.

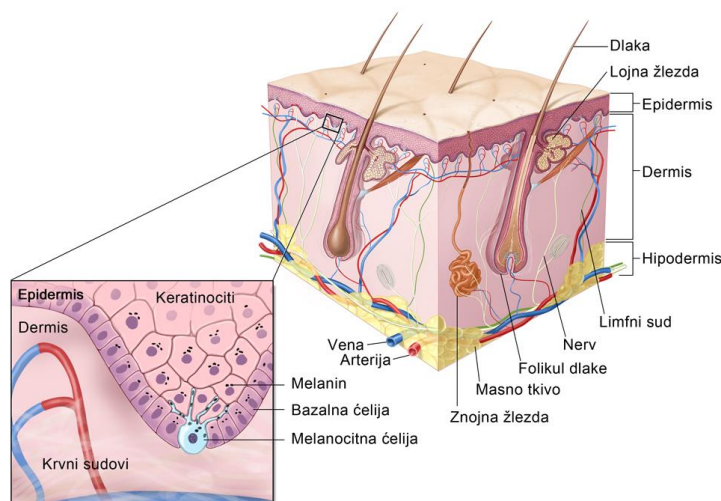
Veliki pomak na polju ranog otkrivanja tumora omogućen je razvitkom dijagnostičkih tehnika koje su bazirane na optičkoj spektroskopiji. Pokazano je da su one brze, pouzdane i manje invazivne ili čak neinvazivne za pacijente. Fluorescentna spektroskopija je jedna od najrazvijenijih kao i najčešće korišćenih tehnika u dijagnostici prekanceroza i kanceroza.

U okviru ove disertacije, biće reči o fluorescentnim spektroskopskim tehnikama i njihovim mogućnostima u diskriminaciji pigmentnih kožnih lezija i zdrave kože. Takođe, ispitaće se primenjivost nekoliko metoda multivarijantne analize u diskriminaciji pomenutih lezija kože. Na kraju, biće pokazane mogućnosti optičke spektroskopske tehnike (difuzne refleksije) u objektivnom određivanju boje kože ljudi.

1.1 Građa, funkcija i klasifikacija kože

Koža je najveći ljudski organ i ujedno jedini organ koji je direktno izložen ultraljubičastom zračenju. Sastoji se iz tri osnovna sloja: površinskog-epidermisa, srednjeg-dermisa i potkožnog sloja-hipodermisa (slika 1.1.). Epidermis predstavlja višeslojni pločasti keratizovan epitel koji neposredno štiti organizam od spoljašnjih uticaja sredine. Izgrađen je od četiri tipa ćelija: keratinocita koje čine 95% ćelija

epidermisa, melanocita koje su lokalizovane u bazalnom sloju epidermisa, langerhansovih ćelija koje učestvuju u imunom odgovoru kože i merkelovih ćelija koje imaju funkciju mehanosenzornih receptora (McGrath, 2010). Dermis je srednji sloj kože koji je u najvećoj meri izgrađen od kolagenih i elastičnih vlakana. Sastoji se od dva podsloja: tankog papilarnog dermisa čija je osnovna funkcija u povezivanju epidermisa i dermisa kao i debljeg retikularnog dermisa u kome se nalaze krvni i limfni sudovi i nervi koji vaskularizuju i inervišu kožu, lojne i znojne žlezde i folikuli dlake. Dermis obezbeđuje neophodnu energiju i hranjive materije epidermisu i ima značajnu ulogu u procesima termoregulacije i regeneracije kože. Poslednji sloj kože je hipodermis koji se uglavnom sastoji od masnog tkiva različite debljine u zavisnosti od regije tela i predstavlja “izolacionu” zonu kako bi se sprečio suvišan gubitak toplote.



Slika 1.1. Anatomska struktura kože čoveka

Koža vrši mnogobrojne funkcije, predstavlja organ koji je najizloženiji uticajima spoljašnje sredine te je osnovna funkcija kože zaštitna jer štiti telo od mehaničkih, fizičkih kao i hemijskih uticaja sredine. Takođe održava termoregulaciju, čuva i odaje toplotu tela i učestvuje u stvaranju vitamina D. Zadržava materije neophodne organizmu, sprečava ulazak stranih materija (npr. mikroorganizama) te predstavlja prirodnu barijeru. Koža poseduje sopstveni sofisticirani imuni sistem (Ullrich, 2005). Glavne komponente ovog sistema čine: keratinociti koji indukuju sintezu raznih

imunoregulatorskih citokina, langerhansove ćelije koje su glavni antigeni u ćelijama epidermisa, dendritske ćelije i makrofage koje predstavljaju antigene u ćelijama dermisa i specijalni set T limfocita sa sopstvenim receptorima. Ceo sistem je integrisan u limfnim čvorovima gde migriraju langerhansove ćelije kao posledica lokalne antigenske stimulacije. Tokom migracije langerhansovih ćelija iz epidermisa dolazi do njihovog sazrevanja što rezultuje aktiviranjem primarnih T ćelijskih odgovora u parakortikalnom regionu limfnog čvora. Neke od aktiviranih T ćelija dolaze do mesta inflamacije u koži i dalje bivaju stimulisane medijatorima koji su prvenstveno sintetisani od strane keratinocita i mastocita. Citokinski profil T ćelija velikim delom određuje tip imunog odgovora kao i njegovu efikasnost.

1.2 Fototipovi kože

Boja kože isključivo zavisi od koncentracije i distribucije ćelijskih hromofora melanina i hemoglobina gde melanin ima primarnu ulogu u obojenosti kože. Melanin se sintetise u melanozomima koji se nalaze u melanocitnim ćelijama. Postoje dve različite hemijske forme melanina: braon ili crni pigment eumelanin i žuti ili crveni pigment feomelanin. Eumelanin je dominantna hromofora koja utiče na boju kože, kao i primarni fotoprotektivni molekul u koži, dok feomelanin utiče na suptilne nijanse boje kože.

Sunčeva svetlost je sastavljena od spektra elektromagnetnih zraka koji su podeljeni u tri veća regiona talasnih dužina: ultraljubičasti region (UV), vidljivi region (VIS) i infracrveni region (IR). Ultraljubičasti region je dalje podeljen u tri regiona, svaki sa različitim biološkim efektima: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) i UVC (200-280 nm). Ozonski omotač stratosfere efektivno blokira UVC zračenje, te ono ne stiže do Zemlje, dok UVA i UVB zračenje ostvaruje značajne biološke efekte na kožu i oči (Matsumura, 2004). Količina UVA zračenja koja stiže do Zemlje je otprilike dvadeset puta veća od UVB zračenja. Ultraljubičasto zračenje predstavlja jedno od najznačajnijih opštih opasnosti životne sredine jer utiče na skoro svaki živi organizam.

Koža je najveći ljudski organ i ujedno jedini organ koji je direktno izložen ultraljubičastom zračenju. Efekat zračenja na koži zavisi od transmisije i apsorpcije

određene talasne dužine. U humanoj koži UVB zračenje se prvenstveno apsorbira u stratum korneum i u manjoj meri u epidermisu. Međutim, veoma mala količina UVB zračenja koja stigne do dermisa izaziva značajne biološke efekte kao što je eritem kože. Hronično izlaganje UV zračenju izaziva prerano starenje kože (fotostarenje) (Ficher, 1997), lokalnu i sistemsku imunosupresiju i fotokarcinogenezu. Razumevanje molekularnih mehanizama procesa UV-zavisne signalne transdukcije je od velike važnosti u pronalaženju odgovora kako UV zračenje oštećuje kožu.

Fotostarenje je dugotrajan proces koji nastaje hroničnim izlaganjem kože ultraljubičastom zračenju. Takvu kožu karakteriše gubitak tonusa i elastičnosti, suvoća i izboranost, neregularna pigmentacija i duboko brazdanje (Kligman, 1986). Ovakav fenotip je posledica nepravilnosti u ćelijskim funkcijama naročito u vanćelijskom matriksu dermisa kože. Dermis predstavlja strukturnu potporu kože i hronično izlaganje UV zračenju rezultuje fragmentacijom i dezorganizacijom primarnih strukturnih proteina elastina i kolagena.

Uzimajući kao kriterijume boju kože kao i njenu osetljivost na Sunce razlikuju se 6 fototipova kože. U tabeli 1.1 je prikazan Ficpatrikov sistem klasifikacije fototipova kože koji predstavlja skalu intenziteta pigmentisanosti kože i njene osetljivosti na Sunce (Fitzpatrick, 1988).

Tabela 1.1 Ficpatrikov sistem klasifikacije fototipova kože

Fototip kože	Boja kože	Reakcija kože na Sunce
FOTOTIP I	Osobe bele kože , svelte puti, svetlih očiju, svelte ili crvene kose	Uvek pocrveni Nikad ne pocrni
FOTOTIP II	Osobe bele kože , svelte ili blago tamne puti, svelte ili smeđe kose, svetlih ili smeđih očiju	Uvek pocrveni Minimalno pocrni
FOTOTIP III	Osobe bele kože , blago tamne ili tamne puti, smeđe ili crne kose, smeđih očiju	Povremeno pocrveni Pocrni srednje i postepeno
FOTOTIP IV	Osobe svetlo braon kože , izrazito tamne puti, tamne kose i očiju	Povremeno/retko pocrveni Dobro pocrni
FOTOTIP V	Osobe indijskog tipa, braon kože	Retko pocrveni Izrazito dobro pocrni
FOTOTIP VI	Osobe afričkog tipa, crne kože	Nikad ne pocrveni Izrazito dobro pocrni

1.3 Kanceri i pigmentne lezije kože

Kancer može da se razvije iz skoro svake somatske ćelije u telu, te koža ne predstavlja izuzetak. Većina kancera kože se razvija iz nepigmentnih ćelija kože. Najčešće vrste karcinoma kože koje se pojavljuju u ljudskoj populaciji su **bazocelularni** (*engl.* Basal Cell Carcinoma, **BCC**) i **planocelularni** (*engl.* Squamous cell carcinoma, **SCC**) karcinomi. Obe vrste nastaju u epidermisu kože, oštećenjem keratinocita. BCC je najčešći karcinom kože ljudske populacije, sporo se razvija, lokalno je invazivan i relativno retko daje metastaze. Po učestalosti javljanja, SCC se pojavljuje odmah posle BCC-a kože. U ranoj neinvazivnoj fazi potpuno je izlečiv, dok u kasnoj invazivnoj fazi ima mogućnost metastaziranja u okolna tkiva i unutrašnje organe. Međutim, iako ima manju učestalost, maligni melanom predstavlja najagresivniji oblik karcinoma kože. Melanomi su maligni tumori koji nastaju proliferacijom i transformacijom melanocita koji su primarno lokalizovani u bazalnom sloju epidermisa. Primarni kožni melanom može da nastane iz prekursorskih lezija (lentiginozni melanom, displastični nevus i kongenitalni nevus) ili direktno iz zdrave kože (Reed, 1985). Ćelije melanoma karakteriše relativno velika ćelijska autonomija, njihov rast je pod autokrinom kontrolom koja se ostvaruje sekrecijom peptidnih faktora rasta kao što su osnovni faktor rasta fibroblasta (bFGF), faktor rasta trombocita (PDGF), transformišući faktor rasta (TGF) ili interleukin-1(IL-1) (Braud, 2003).

Učestalost pojavljivanja melanoma kože u Evropskoj populaciji iznosi 1% i 1,8% tumora koji se javljaju kod muškaraca i žena, respektivno. Činjenica je da se svake godine dijagnostikuje 17000 novih slučajeva oboljevanja kao i 5000 smrtnih ishoda od ove bolesti. U poslednje vreme, broj dijagnostikovanih slučajeva melanoma kože je u stalnom porastu i to je jedan od tumora sa najvećom ekspanzijom. Godišnje, povećanje broja obolelih je 4-5%, što znači da se broj obolelih udvostruči svakih 10-15 godina (Johnson, 1998).

Melanom se najčešće pojavljuje oko 45 godine života, izrazito retko pre puberteta, dok se učestalost nastanka povećava posle pete dekade života. Posebno treba naglasiti, da se u generativnom periodu žene melanom nalazi na prvom ili drugom mestu po učestalosti javljanja. Melanom se može javiti na bilo kom delu tela, kod žena

je najčešći na nogama a kod muškaraca na leđima. Faktori rizika za nastanak melanoma su: izloženost ultraljubičastom zračenju, fenotip pacijenta, porodična istorija tj. genetska predispozicija (Braud, 2003). Važan faktor rizika predstavlja i fototip kože. Stanovništvo sa fototipom kože I (osobe svetlo bele boje kože, zelenkaste oči, crvenkasta kosa tzv. "keltski tip") spada u visokorizičnu grupu. Sledeća rizična grupa je tip kože II (svetla boja kože, plave oči, plava kosa...). Takođe, osobe koje imaju kserodermu pigmentozu (*engl.* Xeroderma pigmentosum) često kasnije u životu dobiju melanom.

Uticaj hormona na nastanak i razvoj melanoma je bio predmet proučavanja u medicini i biologiji tokom proteklih decenija prošlog veka (Gupta, 2010). U literaturi postoje brojni podaci koji dovode u vezu hormone i razvoj različitih vrsta kancera (tumor dojke, jajnika, itd.).

Ranih 50-tih godina prošlog veka počela su ispitivanja o mogućoj vezi hormona i melanoma. Uočeno je da se melanom češće javlja kod žena, kao i da je procenat njegovog nastanka pre puberteta nizak a da se povećava tokom reproduktivnog perioda. Utvrđeno je da žene kod kojih je dijagnostikovao melanom tokom trudnoće imaju lošiju prognozu preživljavanja (Pack, 1951). Takođe, promene u pigmentaciji kože (melazma) se mogu javiti pod uticajem hormona, nevusi tamne i uvećavaju se (Winton, 1982). Rezultati eksperimenata rađenih na životinjama ukazuju na povećanu produkciju melanocita i sintezu melanina pod uticajem estrogena ili kombinacije progesterona i estrogena (Snell, 1960). Brojna istraživanja koja su urađena prošlih decenija bavila su se uticajem endogenih i egzogenih hormona na nastanak i razvoj malignog melanoma. Melanom je jedan od najopasnijih karcinoma ljudske populacije. Njegova opasnost se ogleda u tome što on ima izuzetno veliki potencijal za nastanak metastaza. U slučajevima kada se kasno dijagnostikuje melanom predstavlja jedan od najopasnijih karcinoma sa velikom smrtnošću, dok je potpuno izlečiv kada se rano dijagnostikuje i leči.

Debljina tumora i njegova ulceracija predstavljaju jedne od najbitnijih faktora za lokalizaciju kožnog melanoma. Dubina tumora se meri u milimetrima od granularnog sloja epidermisa do najdublje ćelije tumora. Sa povećanjem dubine prodiranja melanoma povećava se njegova invazivnost, a smanjuje se procenat preživljavanja pacijenata. Uzimajući kao kriterijum dubinu prodiranja tumora, Klarkovom podelom je

definisano pet stadijuma napredovanja tumora (Clark, 1969). Prvi stadijum karakteriše melanom *in situ* tj. ćelije melanoma su rasprostranjene do bazalne membrane kože. U drugom stadijumu ćelije melanoma prodiru u papilarni dermis, dok u trećem stadijumu napreduju do retikularnog dermisa. Četvrti stadijum podrazumeva infiltraciju ćelija melanoma u retikularni dermis dok u poslednjem petom stadijumu ćelije melanoma prodiru u okolno potkožno tkivo. Uzimajući kao kriterijum debljinu tumora, American Joint Committee on Cancer (AJCC) i Union Internationale Contre le Cancer (UICC) 2001. godine su klasifikovali melanom u četiri kategorije (Balch, 2001). U tabeli 1.2 su prikazane pomenute kategorije melanoma kao i petogodišnja prognoza preživljavanja pacijenata sa melanomom u zavisnosti od prisustva ili odsustva ulceracije (razjedanje).

Tabela 1.2 Klasifikacija melanoma po debljini

Debljina melanoma (mm)	5-godišnja prognoza preživljavanja (%)	
	ulcerativni	neulcerativni
< 1 mm	91	95
1.01 - 2.0 mm	77	89
2.01 - 4.0 mm	63	79
> 4 mm	45	67

Maligni melanom ima dve faze rasta: radijalnu i vertikalnu. Tokom radijalne faze, maligne ćelije se šire kružno po epidermisu. Vremenom melanom počinje da raste vertikalno, pri čemu prodire u dermis i daje metastaze. Klinički, prema dubini lezije, klasifikuju se kao tanke lezije do 1 mm, umereno debele do 4 mm i debele lezije preko 4 mm.

1.4 Pigmentne lezije kože

Pigmentne lezije od kojih su najpoznatiji mladeži ili nevusi, su sastavni delovi zdrave kože iako predstavljaju faktore rizika za nastanak melanoma. Ove promene nastaju kada rast i grupisanje melanocita u klastere uključuje i okolne ćelije kože. Najčešće pigmentne lezije su:

Nevus (tipičan mladež) je dobroćudna pigmentna promena na koži, najčešće braon do crne boje, nastala nepravilnim grupisanjem melanocitnih ćelija u koži. Najveći broj mladeža je veličine od par mm do 1 cm. Većina mladeža su bezopasne promene na koži, ali postoje i mladeži sa većom šansom za nastanak melanoma. Tipični mladeži (obični ili regularni) su najčešće veličine do 6 mm u prečniku, jednobojni, od svetlo braon do crne boje, simetričnog izgleda, jasnih ivica. Nastaju tokom prvih 20 godina života, svojom veličinom prate rast tela, ali ne menjaju bitnije svoj izgled i boju. Tipičan mladež može biti u ravni kože, iznad ili ispod ravni kože, sa ili bez dlaka.

Plavi nevus (*engl.* Blue Nevus) je melanocitni nevus sastavljen od aberantnih pigment-sintetišućih melanocita koje se uglavnom nalaze u dermisu. Plava ili plavo-crna boja mladeža je posledica refleksije svetlosti na melanin iz dubljih slojeva dermisa kože.

Displastičan ili atipičan nevus je mladež veći od 6 mm u prečniku, višebojan, nepravilnog oblika, isprekidanih ili nejasnih ivica. Ove osobine se mogu uočiti golim okom. Osobe koje imaju veći broj displastičnih mladeža mogu biti u većem riziku od nastanka melanoma. Učestalost nastanka melanoma iz displastičnog nevusa iznosi 1 prema 3 000 slučajeva na godišnjem nivou, što ove mladeže čini markerima povećanog rizika za nastanak melanoma (Braud, 2003).

Kongenitalni nevus (urođeni mladež) je mladež koji se uočava na rođenju ili u prvim danima nakon rođenja. Po veličini ovi mladeži su podeljeni na male (do 1,5 cm prečnika), srednje (od 1,5 do 10 cm), velike (od 11 do 20 cm) i gigantske (veće od 20 cm prečnika). Verovatnoća da se u urođenom mladežu razvije melanom, raste sa njegovom veličinom.

Pigmentni „Spitz” nevus predstavlja atipičan dobroćudni mladež koji se najčešće javlja kod dece. Po karakteristikama je vrlo sličan melanomu te zahteva preciznu dijagnostiku (Newton Bishop, 2010).

Meki fibromi ili viseće bradavice su uobičajene benigne kožne izrasline koje izgledaju poput malog dela viseće kože. Rani ili početni kožni fibromi mogu biti mali kao izbočena tačka oko vrata, dok neki kožni viseći fibromi mogu biti veličine grozda. Mogu se pojaviti bilo gde na koži, ali najčešća mesta pojavljivanja su kapci, vrat, pazusi, gornji deo trupa (naročito ispod dojki kod žena) te regija prepona. Sve u svemu to su benigne rastuće promene koje nemaju karcenogeni (maligni) potencijal.

Seboroična keratoza je dobroćudni tumor površinskog sloja kože koja najčešće izgleda kao nalepak ili osušena krasta. U osnovi razlikuju se dva tipa pojavljivanja ovih promena, a to su pojedinačno i grupno javljanje. Kod pojedinačnih promena, one se uočavaju kao male promene (do 10 mm) u vidu bradavica, mladeža ili izdignutih izraslina sa osušenom površinom. Kada se javljaju u grupama, najčešće su lokalizovane na vratu, leđima i licu. Ove promene se javljaju kod oba pola sa istom zastupljenošću. Iako je njihovim uklanjanjem izlečenje potpuno, mogu se ponovo javiti na istom mestu kada nisu potpuno uklonjene.

1.5 Histološka klasifikacija melanoma

Melanomi se mogu klasifikovati u četiri osnovna tipa. U tabeli 1.3 prikazana je lokalizacija i učestalost pomenutih tipova melanoma kao i pete posebne grupe neklasifikovanih melanoma.

Tabela 1.3 Histološki tipovi melanoma

Tip melanoma	Učestalost	Lokalizacija	Starost pacijenata u vreme dijagnoze	Brzina rasta u dubinu
Lentiginozni maligni melanom	5%	Lice, poledina, šake	Preko 60 godina	Godine i decenije
Melanom sa površinskim širenjem	65%	Svi regioni izloženi suncu	30-60 godina	Meseci do 1 godina
Nodularni (sa čvorićima)	15%	Svi regioni izloženi suncu	40-60 godina	Meseci do 1 godina
Akralni lentiginozni melanom	5%	Akre (šake, noge...) nokti	40-60 godina	Do 3 godine
Neklasifikovani melanomi	10%	Usta, oko, nervni sistem, sluzokoža	40-60 godina	meseci

Lentiginozni melanom se javlja na delovima tela koji su izloženi Suncu. Predstavlja preinvazivnu, površinsku formu iz koje se kasnije može razviti invazivni lentiginozni maligni melanom. Najčešće se javlja kod starijih ljudi (osma ili deveta decenija života). Promene se javljaju u obliku fleka na koži, veličine od nekoliko milimetara do nekoliko centimetara, nepravilnih ivica, tamno-braon do crne boje.

Tumor je lokalizovan u nivou kože, ne može se napipati. Lentigo maligni melanom je kasnija, invazivna forma koja se može napipati u obliku čvorića. Epitel je atrofičan, u bazalnom sloju su prisutne vakuolizovane ćelije sa atipijom jedra i patološkim deobama.

Melanom sa površinskim širenjem je najčešći histološki tip melanoma koji se javlja u početnoj fazi. Uglavnom se sreće kod odraslih ljudi. Promene su blago odignute, mogu se opipati, tamno braon do crne boje, veličine od nekoliko milimetara do nekoliko centimetara. Granica lezija je policikličnog oblika, nepravilna ali uglavnom oštra. Tumor napreduje vrlo brzo i prelazak u invazivni oblik (drugi stadijum) se dešava u roku od nekoliko meseci do nekoliko godina. Tumorske ćelije su uglavnom lokalizovane u graničnoj zoni između epidermisa i dermisa, delimično iznad i ispod bazalne membrane, ali prisutna je i difuzna invazija epidermisa.

Nodularni melanom je najagresivnija forma melanoma i predstavlja jednu trećinu od svih dijagnostikovanih melanoma kod pripadnika bele rase na godišnjem nivou. Tumor ne raste horizontalno, već vertikalno, što rezultuje invazijom tumora u dublje slojeve kože u periodu od nekoliko meseci. Prisutne su i brojne erozije kože kao i krvarenja. Polipoidni melanom predstavlja formu nodularnog melanoma koga karakteriše grupisanje velikog broja ćelija melanoma iznad površine kože. Kako tumor napreduje, zahvata i okolne limfne sudove što značajno smanjuje prognozu preživljavanja.

Akralni lentiginozni melanom se javlja pretežno kod starijih osoba (preko 60 godina) i ima nešto lošiju prognozu od običnog lentiginoznog melanoma. Najčešće zahvata šake, stopala, uši, prste, nokte. Promene su vidljive u vidu policikličnih, braon fleka iz kojih nastaju čvorići koji su često depigmentovani. Retko se javlja kod pripadnika bele rase, dok kod pripadnika crne rase, Latinoamerikanaca i Azijata predstavlja 35% od svih dijagnostikovanih formi melanoma.

Depigmentovani melanom pripada grupi posebnih oblika melanoma i ujedno se retko javlja. Povezuje se sa lentiginoznim melanomom jer se javlja na mestima koja su izložena Suncu kao što je lice. Varijante ovog melanoma su i neurotransformišući melanom kao i neurotropni melanom. Ovaj oblik melanoma ima tendenciju brzog širenja na okolne krvne sudove i zbog toga je bitna precizna dijagnostika u početnom stadijumu nastanka.

Melanom sa totalnom ili parcijalnom regresijom nastaje usled dejstva imunološkog sistema. Lezije su belo-plave boje, lokalizovane ispod nivoa kože, nepravilnih ivica.

Uvealni melanom predstavlja veoma agresivni oblik intraokularnog tumora kod odraslih. Može se javiti na bilo kom delu srednje očne ovojnice (uvee). Oko 90% melanoma uvee nastaje u sudovnjači. To je redak tumor i učestalost raste sa starošću, a vrhunac incidence je oko 60 godina. U početnoj fazi uvealni melanom može dovesti do oštećenja vida, dok u uznapredovaloj fazi dolazi do potpunog gubitka vida. Melanom uvee metastazira hematogeno i/ili limfogeno. Hematogeno širenje je češće nego limfno. Većina pacijenata sa metastazama ima lošu prognozu preživljavanja (do godinu dana) od pojave prvih simptoma (Singh, 2005).

Mukozni melanom može nastati na mukozni respiratornog, gastrointestinalnog ili genitourinarnog trakta. Javlja se u 3% slučajeva, a lezije se mogu naći na konjuktivi, sluznici usta, ezofagusu, ženskoj uretri. Nekutani melanomi se obično dijagnostikuju kod starijih osoba. Mukozni oblici su agresivniji od kutanih oblika, ali može da se radi o kasnijem dijagnostikovanju, jer nisu toliko uočljivi kao kutane forme.

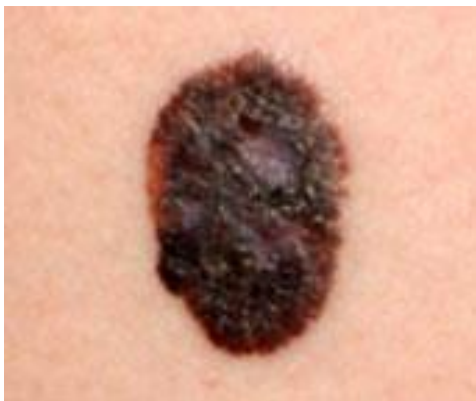
1.6 Kliničko dijagnostikovanje kancera kože

Rana dijagnostika nekog kožnog tumora predstavlja najvažniji korak u izlečenju bolesti. Promene u veličini i boji kožne lezije su najčešće promene koje se uočavaju tokom inicijalnog lekarskog pregleda kod skoro 70% pacijenata (Wick, 1980). Prisustvo simptoma kao što su krvarenje, svrab ili razjeda (ulceracija) kožne promene se uglavnom povezuje sa lošim prognozama, jer se ovi simptomi najčešće javljaju u poodmakloj fazi bolesti. Prvi korak u dijagnostikovanju određene sumnjive kožne promene započinje detaljnim kliničkim pregledom od strane doktora specijaliste tj. dermatologa (Whited, 1997).

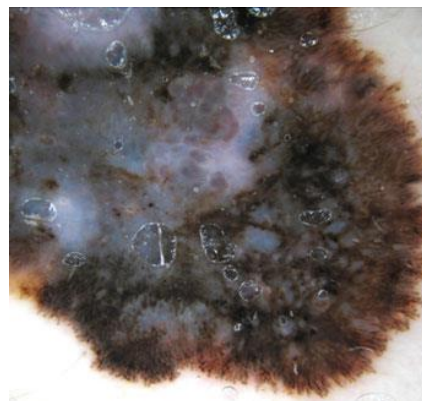
Osamdesetih godina dvadesetog veka u praksu je uvedeno "ABCD pravilo" (Friedman, 1985). Zasnovano je na jednostavnim morfološkim karakteristikama melanoma kao što su asimetrija, neregularnost ivica, boja i prečnik koji prelazi 6 mm.

Ovaj klinički algoritam se koristi i danas širom sveta, omogućavajući ranu detekciju melanoma. Kasnije je uveden i peti kriterijum pod imenom „razvojni“ (*engl.* evolving) koji opisuje promene koje se razvijaju u leziji tokom vremena ("ABCDE pravila") (Abbasi, 2004). Osetljivost ovog kliničkog algoritma iznosi od 65-80%, sa tendencijom da se ne može sa velikim uspehom primeniti na male melanome tj. na one koji su manji od 6 mm u prečniku. Takvi mali, rani melanomi se često ne mogu otkriti "ABCDE pravilom", jer melanomi u jako ranom stadijumu mogu biti normalnog oblika i homogene boje. Takođe, u dijagnostici melanoma koristi se i algoritam pod nazivom „Glasgovih sedam tačaka provere“ (*engl.* Glasgow 7-point checklist) (Mackie, 1991). On definiše sedam kriterijuma koji opisuju leziju, tri glavna (promene u veličini, obliku i boji lezije) dok su preostala četiri kriterijuma: dijametar lezije veći od 7 mm, inflamacija, krvarenje i senzorne promene.

U cilju što preciznije vizualizacije ranog stadijuma melanoma, kombinujući pomenute dermatoskopske algoritme, danas se koristi tehnika pod nazivom **dermoskopija**, poznata i kao **epiluminescentna spektroskopija**. Dermoskopija ili pojačana površinska mikroskopija (*engl.* Amplified surface microscopy) je *in vivo* metod koji je jako koristan za rano prepoznavanje malignih melanoma, karcinoma kože, mladeža i svih ostalih pigmentnih promena na koži. Dermoskopija je bezbolna, neinvazivna metoda gde se na osnovu mikroskopske analize kožne promene u različitim slojevima, postavlja veoma precizna dijagnoza sa tačnošću od 92-99%. Princip rada ove tehnike podrazumeva da se svetlost reflektuje, rasejava ili apsorbuje od strane sloja kože, zbog indeksa prelamanja i optičke gustine koja je različita od vazduha. Iz tog razloga se dublje strukture ne mogu adekvatno vizualizovati. Međutim, mogu se koristiti različite tečnosti da bi se površina kože učinila translucentnom (providnom) i redukovala se refleksija. Na taj način dublji slojevi postaju lako vidljivi. Primenom staklene ploče se poravnava površina kože i ujedno obezbeđuje ravna površina. Optičko uvećanje se takođe koristi. Korišćenjem ove metode, ispitivana lezija kože se posmatra pod 10 ili 20 puta optičkim uvećanjem što omogućava lekarima da vide strukture koje nisu vidljive golim okom. Zbog toga ova metoda ima znatan dijagnostički potencijal. Na slikama 1.2. i 1.3. su prikazani klinički izgled melanoma kao i dermoskopski nalaz istog.



Slika 1.2. Klinička fotografija melanoma



Slika 1.3. Dermoskopski prikaz melanoma

U dermatološkoj praksi, danas su u upotrebi različite modifikacije dermatoskopske metode kao što je *transiluminaciona* tehnika (*engl.* Transillumination technique, TLM). Transiluminacija je tehnika osvetljivanja uzorka transmisijom svetlosti kroz njega, a ovom tehnikom moguća je uspešna identifikacija vrste kožnih lezija (Dhawan, 1992).

Iako su se dermoskopske metode pokazale veoma uspešnim u dijagnostici različitih kožnih promena, glavni nedostatak ovih metoda je njihova subjektivnost tj. one zavise od rasuđivanja i kliničkog iskustva lekara. Čak i lekari sa velikim dijagnostičkim iskustvom nailaze na poteškoće prilikom dijagnostikovanja malignog melanoma ili benignih lezija, tako da se dešava da dijagnoze budu lažno pozitivne ili što je još gore lažno negativne. Zbog toga se danas intenzivno radi na razvijanju efektne tehnike koja je brza i objektivna, u cilju preciznog dijagnostikovanja različitih kožnih promena.

Ako pri kliničkom pregledu postoji sumnja da je ispitivana lezija melanom, pristupa se proceduri koja se naziva *biopsija kože*. Biopsija (grčki: bios= život, opsein = gledati/ izgled) predstavlja medicinsku tehniku koja uključuje uzimanje ćelija ili tkiva za patohistološki (PH) pregled u cilju postavljanja ili potvrđivanja odgovarajuće kliničke dijagnoze. Različite metode mogu da se koriste tokom biopsije kože.

Biopsija „ljušćenjem“ (*engl.* Shave biopsy) podrazumeva uzimanje površinskih slojeva kože malim hirurškim skalpelom. Najčešće se uklanja epidermis kao i gornji slojevi dermisa, mada ako je potrebno mogu se ukloniti i dublji slojevi dermisa. Ova metoda je korisna za dijagnozu različitih vrsta kožnih tumora.

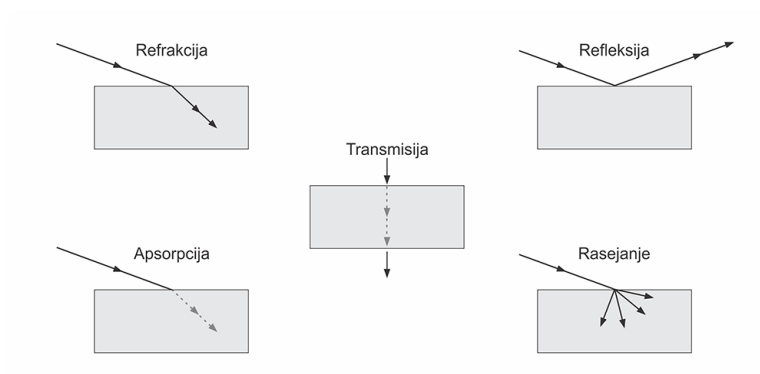
„Ubodnom“ biopsijom (*engl.* Punch biopsy) se uklanjaju dublji slojevi kože instrumentom koji liči na okruglo sečivo za kolače. Ovom metodom se uklanja epidermis, dermis kao i gornji slojevi hipodermisa ispitivane kožne promene.

Da bi se utvrdilo da li je tumor zahvatio dublje slojeve kože često se koriste „*inciziona*“ i „*eksciziona*“ biopsija. Incizionom biosijom uzima se samo deo tumora koji se šalje patologu na pregled, dok se ekscizionom biopsijom uzima kompletan tumor, tako da se ovaj tip biopsije najčešće koristi ako postoji sumnja da je ispitivana promena melanom. Tako se eksciziona biopsija može koristiti i u terapijske svrhe.

1.7 Optičke osobine tkiva

Spektroskopija se bavi proučavanjem interakcije elektromagnetnog zračenja sa materijom. Ultraljubičasti-vidljivi region je uska oblast elektromagnetnog zračenja (100-750 nm) u kome je prisutna značajna apsorpcija zračenja od strane molekula. Biološki sistemi predstavljaju složene molekulske medijume. Za takve medijume, interakcija sa svetlošću se može okarakterisati elektronskom polarizacijom molekula koji je pod uticajem električnog polja. Prilikom interakcije elektromagnetnog zračenja i tkiva jedan deo svetlosti se reflektuje sa površine tkiva, drugi se prostire kroz njega, a treći prolazi, tj. transmituje kroz tkivo. Deo svetlosti koji se reflektuje uglavnom je mali. Najveći deo se apsorbuje, a ostatak se transmituje. U principu, razlikuje se 5 pojava koje se javljaju prilikom interakcije svetlosti sa tkivom (slika 1.4.) i to su:

- ❖ Refleksija
- ❖ Refrakcija
- ❖ Transmisija
- ❖ Apsorpcija
- ❖ Rasejanje



Slika 1.4. Šematski prikaz interakcije svetlosti i tkiva

Prilikom **refrakcije** svetlosni talasi se prostiru kroz materiju manjom brzinom nego u slobodnom prostoru, što dovodi do njihovog savijanja na granicama objekata. Refrakcija sama po sebi ne utiče na intenzitet svetlosti koja se širi kroz materiju.

Apsorpcija se javlja ako je energija elektromagnetnog zračenja takva da može da pobudi, odnosno, da eksituje elektron iz osnovnog energetskeg stanja u stanje više energije. Apsorpcija zavisi od unutarćelijskih kao i vanćelijskih struktura tkiva. Dubina prodiranja svetlosti kroz tkivo predstavlja važan faktor koji zavisi od apsorpcionih osobina tkiva, što znači da sa porastom talasne dužine pobudne svetlosti dolazi do smanjenja apsorpcione moći tkiva dok se povećava dubina prodiranja svetlosti kroz tkivo.

Refleksija svetlosti uglavnom potiče sa površine tkiva. Što je veći upadni ugao svetlosti, veća je refleksija sa površine tkiva, što znači da će najviše svetlosti proći kroz tkivo kada je upadni ugao 90 stepeni. Svetlost se odbija od svakog tela. Ako se snop svetlosti odbija od ravne glatke površine, dolazi do usmerenog odbijanja (ogledalska refleksija), dok ako je površina neravna (kao kod tkiva) zraci se odbijaju u različitim pravcima (difuzna refleksija).

Rasejanje je pojava koja se javlja pri prolasku svetlosti kroz materiju kada dolazi do promene pravca svetlosti u interakciji sa istom. Prilikom interakcije svetlosti sa materijom dolazi do smanjenja intenziteta svetlosti. U osnovi, rasejanje može biti elastično kada je frekvencija rasejane svetlosti nepromenjena, ili neelastično kada dolazi do promene frekvencije svetlosti. Najizraženiji efekat pri interakciji svetlosti i tkiva je upravo rasejanje koje potiče od heterogenih struktura tkiva: makromolekula, ćelijskih organela i određene količine vode. Prilikom rasejanja svetlosti dolazi do širenja kolimisanog zraka svetlosti, što ima za posledicu gubitak njegove inicijalne usmerenosti kao i širenja fokusa svetlosnog snopa. Može se zaključiti da se pomoću karakteristika rasejane svetlosti (intenzitet svetlosti, itd.) mogu dobiti informacije o strukturi tkiva.

1.8 Luminescencija

Luminescencija je opšti naziv za pojavu emisije elektromagnetnog zračenja iz materije, uglavnom vidljive svetlosti, koja sledi posle prethodne apsorpcije energije. Do ove pojave dolazi kada je vreme između apsorpcije i emisije zračenja veće od trajanja perioda oscilacije zračenja. Na osnovu ovog procesa moguće je dobiti niz važnih podataka o biomolekulima kao što su karakteristične talasne dužine emitovane svetlosti, intenzitet emisije, itd.

U osnovi se sve luminescentne tehnike zasnivaju na detekciji i analizi elektromagnetnog zračenja emitovanog iz materije nastalog usled spoljašnjih energetskih perturbacija. U zavisnosti od načina kojim je izvršena promena energetskih stanja, luminescencija se može podeliti u više kategorija od kojih su najznačajnije prikazane na Slici 1.5.

Fluorescencija i fosforescencija su pojave nastale apsorpcijom fotona svetlosti, pa se najčešće zovu zajedničkim imenom **fotoluminescencija**. Talasna dužina emitovane svetlosti nakon nekog od ova dva procesa je veća, usled gubitka energije prilikom interakcije svetlosti sa molekulom. U toku fotoluminescencije molekul apsorbuje svetlost i prelazi u pobuđeno stanje. Vreme života nekog energetskog stanja molekula je srednje vreme koje molekul provede u pobuđenom stanju do povratka u osnovno stanje.

Elektroluminescencija je pojava nastala u gasu ili čvrstom telu primenom elektromagnetnog polja. Usled elektronske perturbacije u materijalu dolazi do pobude molekula. **Triboluminescencija** je poseban vid elektroluminescencije i javlja se kada se materijal zagrebe, zgnječi ili se na njega mehanički deluje na bilo koji način. Mehanički stres dovodi do prostornog razdvajanja naelektrisanja u materijalu. Posle određenog vremena naelektrisane čestice se rekombinuju emitujući svetlost. Kada se luminescencija javlja u toku kristalizacije reč je o **kristaloluminescenciji**, dok kod **sonoluminescencije** pobudu izaziva zvuk.

Hemiluminescencija je fenomen koji počiva na hemijskoj reakciji nastanka određenog jedinjenja koja je praćena emisijom svetlosti. Mnoge hemijske reakcije proizvode i svetlost i toplotu, dok se kod znatno manjeg broja reakcija kao proizvod

javlja samo svetlost bez oslobađanja toplote. Svetlost nastala u takvim reakcijama naziva se “hladna svetlost“, a hemijska reakcija hemiluminescentna. Veliki broj ovih reakcija javlja se u živim organizmima, a sama pojava poznata je kao **bioluminescencija**.

Radioluminescencija je vrsta luminescencije koja se javlja usled pobuđivanja česticama visoke energije ili zračenjem. U zavisnosti od izvora pobude može se govoriti o α -luminescenciji, jonoluminescenciji i x-zračnoj luminescenciji.

Termoluminescencija je vrsta luminescencije koja se javlja u materijalu koji emituje svetlost kada počne da se zagreva. Usled toplote dolazi do oslobađanja elektrona visoke energije koji su bili zarobljeni u materijalu, a njihovim povratkom iz pobuđenog stanja dolazi do emisije svetlosti.



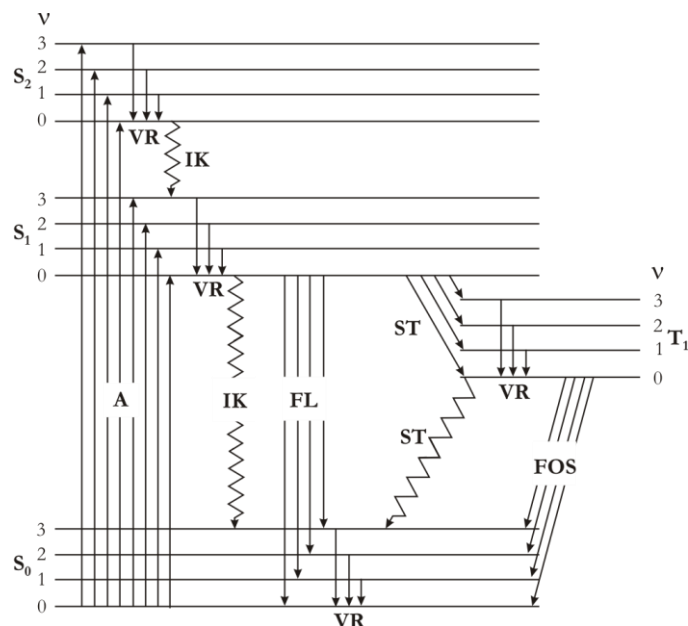
Slika1.5. Šematski prikaz različitih tipova luminescentnih procesa

Kako se ova disertacija bavi primenom fotoluminescentne spektroskopije na biološkim tkivima, fundamentalni koncepti i korišćena instrumentacija ove eksperimentalne tehnike će naknadno biti detaljnije objašnjeni.

1.8.1 Fotoluminescencija

Prilikom prolaska svetlosti kroz molekul, deo svetlosti se apsorbuje, pri čemu elektroni prelaze iz osnovnog u viša energetska stanja. Tako pobuđen molekul se mora određenim mehanizmom osloboditi viška energije. Apsorpcione i emisione procese najjednostavnije je objasniti pomoću dijagrama Jablonskog, koji je predložio poljski fizičar Aleksandar Jablonski. Na dijagramu (slika 1.6.) su prikazana elektronska i vibraciona stanja molekula, kao i prelazi između njih. Najniža linija predstavlja stanje najniže energije u osnovnom elektronskom energetskom nivou i označena je sa S_0 , dok su pobuđeni nivoi označeni sa S_1 i S_2 . Takođe, u okviru svakog energetskog nivoa se nalaze 4 vibraciona energetska nivoa $v=0, 1, 2, 3$. Osnovno energetsko stanje, **singletno stanje**, je stanje najniže potencijalne energije i ima dva sparena elektrona sa različitim spin orijentacijama. U osnovi, razlikuju se dva tipa energetskih prelaza, dozvoljeni i nedozvoljeni. Dozvoljeni su prelazi elektrona sa višeg na niži vibracioni nivo, kao i prelazi sa osnovnog vibracionog nivoa $v=0$ pobuđenog stanja na neki od vibracionih nivoa nepobuđenog energetskog stanja. Nedozvoljeni prelaz je prelaz sa bilo kog vibracionog nivoa pobuđenog stanja na neki od vibracionih nivoa osnovnog energetskog stanja. **Eksitovano singletno stanje** je stanje prilikom koga eksitovani elektroni popunjavaju molekulске orbitale formirajući parove elektrona sa spinovima u suprotnim smerovima. Pri prelasku u energetski eksitovano stanje molekul počinje da vibrira i teži da se vrati u najniži vibracioni nivo pobuđenog stanja procesom koji se naziva **vibraciona relaksacija**. Relaksacija ili vraćanje molekula u stanje niže energije se može odigrati na dva načina: radijativno i neradijativno. Prilikom neradijativnog prelaza iz pobuđenog S_1 ili S_2 u osnovno S_0 stanje, relaksacija se javlja u vidu oslobađanja toplotne energije procesom koji se naziva **interna konverzija**. Kod radijativnog prelaza relaksacija se manifestuje kao **fluorescencija**. Ona predstavlja proces emitovanja fotona prilikom relaksacije molekula iz najnižeg vibracionog nivoa ($v=0$) pobuđenog singletnog stanja S_1 u najniži nivo ($v=0$) singletnog stanja S_0 . Do fluorescencije dolazi veoma brzo nakon pobude ($\sim 10^{-9}$ s), dok je energija koja se emituje manja od apsorbovane a emitovana svetlost veće talasne dužine od ulazne.

Fluorofore su molekuli kod kojih je apsorpcija svetlosti praćena emisijom u vidu fluorescencije.



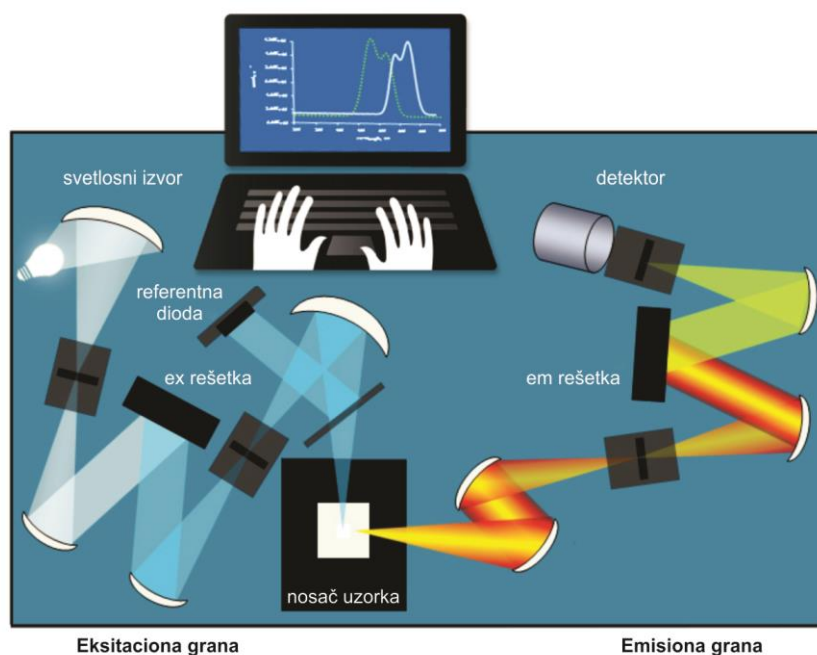
Slika 1.6. Dijagram Jablonskog: S_0 - osnovno singletno stanje, S_1 - prvo singletno ekscitovano stanje, S_2 - drugo singletno ekscitovano stanje, T_1 - tripletno stanje najniže energije, A - proces apsorpcije elektromagnetnog zračenja, VR - vibraciona relaksacija, IK - interna konverzija, FL - fluorescencija, ST - unutarsistemski prelaz, FOS - fosforescencija.

1.8.2 Fosforescencija

Stanje u kome su elektroni nespareni, tj. imaju isti spin se zove **tripletno stanje** i ono je niže energije od odgovarajućeg singletnog stanja. Proces neradijativnog prelaza iz singletnog u tripletno stanje naziva se **unutarsistemski prelaz**. Nakon transfera u tripletno stanje, molekul brzo stiže do najnižeg vibracionog nivoa prvog pobuđenog tripleta procesom vibracione relaksacije. Sa T_1 molekul se na S_0 može vratiti emisijom fotona. Ova emisija se naziva **fosforescencija**. Ovo je proces koji traje duže nego fluorescencija jer se elektron nalazi u spin "zabranjenom" stanju.

1.9 Fluorescentni spektrometar

Stokes je 1852. godine opisao fenomen fluorescencije (Stokes, 1852). Tehnike koje se danas koriste a zasnovane su na ovom efektu, znatno su napredovale i pronašle značajnu primenu u velikom broju različitih oblasti. Za merenje fluorescencije koriste se klasični instrumenti koji se zovu fluorescentni spektrometri. Oni se sastoje iz nekoliko delova: izvora svetlosti, monohromatora ili sistema za selektivno razlaganje talasnih dužina, nosača uzorka i detektora. Na slici 1.7. je dat generalizovani šematski prikaz klasičnog fluorescentnog spektrometra.



Slika 1.7. Šematski prikaz fluorescentnog spektrometra

Izvor svetlosti ili pobude mogu biti lampe ili laseri. Kod komercijalnih uređaja kao izvor svetlosti se najčešće koriste lampe kao što su halogena, ksenonska, živina, volframova i deuterijumska lampa. Kao izvor svetlosti mogu se koristiti i laseri različitih talasnih dužina u zavisnosti od toga koja je talasna dužina potrebna za pobudu ispitivanog materijala. Takođe, izvor svetlosti mora biti velike optičke snage, iz razloga što fluorescentni procesi daju male signale.

Elementi koji selektivno propuštaju svetlost zovu se filtri ili monohromatori. Oni su neophodni ako se kao izvor svetlosti koristi lampa. Monohromator može biti prizma ili difrakciona rešetka. U fluorescentnim spektrometrima danas se uglavnom ugrađuju difrakcione rešetke. Kada se kao izvor svetlosti koristi laser nije neophodno koristiti filter ili monohromator na emisionoj strani uređaja. Istorijski gledano, u upotrebu su prvo uvedeni uređaji sa filterima za koje se danas koristi naziv fluorescentni spektrometar. Ako instrument u sebi ima ugrađen monohromator, tada se naziva **fluorescentni spektrometar** ili **spektrofluorometar**.

Emitovana svetlost iz ispitivanog uzorka se širi u svim pravcima te je moguće izvršiti njenu detekciju pod bilo kojim uglom u odnosu na uzorak. Kada je detektor postavljen pod uglom od 22.8 stepeni u odnosu na pobudni snop svetlosti merenje se vrši u tkz. „Front-face” modu. Pod tim uglom najmanja je količina rasejane svetlosti koja dospeva do detektora. Danas se najčešće koriste dva tipa detektora u UV/VIS spektralnom regionu: fotomultiplikatori i poluprovodničke fotodiode. Idealan detektor je onaj koji daje linearan odgovor u širokom opsegu, sa malo šuma i velikom osetljivošću.

Skenirajući fluorescentni spektrometar omogućava merenje tri vrste spektara: emisionih, eksitacionih i sinhronih spektara. U eksitacionom modu emisiona talasna dužina je fiksna a pritom se menja eksitacija i kao rezultat se dobija **eksitacioni spektar**. Emisiona pretraživanja se vrše na fiksnoj eksitacionoj talasnoj dužini, pri čemu se meri intenzitet emisije u obliku **emisionog spektra**. Kada se istovremeno menja i eksitaciona i emisiona talasna dužina, a održava se konstantna razlika između njih dobija se **sinhroni spektar**.

1.10 Luminescentne spektroskopske tehnike

Kako je ranije rečeno, fenomen fluorescencije je poznat više od sto godina, te su i neke luminescentne tehnike dosta stare. Tokom vremena došlo je do menjanja i usavršavanja ovih tehnika, kao i širenja polja primene. Pokazano je da je fluorescencija pogodna za proučavanje molekulskih interakcija u analitičkoj hemiji, biohemiji,

biologiji ćelije itd. U početku su se koristile emisione i eksitacione tehnike za dobijanje spektara ispitivanih jedinjenja. Međutim, ove tehnike nisu pružale dovoljno informacija o složenim sistemima, tj. nisu mogle da razdvoje luminescentni odziv jedinjenja sa sličnim eksitacionim i emisijom pikovima. Usavršavanjem mernih instrumenata otvarale su se nove mogućnosti kao i prednosti za ispitivanja luminescencije različitih jedinjenja. Tako su nastale tehnike eksitaciono-emisionih matrica, kao i novija sinhrona luminescentna spektroskopija.

Eksitaciono-emisiona matrica (EEM) je tehnika koja ima primenu već dugi niz godina. EEM je trodimenzionalni dijagram kojim se opisuje intenzitet fluorescencije u funkciji eksitacione i emisije talasne dužine. Tokom EEM skeniranja, ispitivani materijal se sukcesivno pobuđuje svetlošću različite talasne dužine. Svaku pobudu prati apsorpcija, a pritom se registruje spektar emisije sa pobuđenih stanja. Nakon serije merenja za različite pobude dobija se EEM trodimenzionalni dijagram.

Sinhrona luminescentna spektroskopija (SLS) je relativno nova luminescentna tehnika koja je veliki uspeh postigla u analitičkoj hemiji (Askari, 2001), kao i analizi višekomponentnih sistema kod kojih dolazi do preklapanja emisijom pikova (Patra, 2002). Teorijske osnove ove tehnike postavio je Lloyd (Lloyd, 1971), dok je Vo-Dinh (Vo-Dinh, 1982) predstavio eksperimentalne procedure kojima je omogućeno merenje spektralnih osobina kompleksnih sistema sinhronom luminescentnom spektroskopijom. Kod ove tehnike sinhrono se menjaju talasna dužina eksitacije i emisije detekcije pri čemu se održava konstantnim interval između njih. U slučaju kada izabrani konstantni interval odgovara razlici između eksitacionog i emisijom maksimuma određene fluorofore njen specifični odziv u merenom spektru biće maksimalno pojačan u odnosu na odziv drugih fluorofora. Zbog toga dobijeni luminescentni spektri poseduju oštrije spektralne karakteristike, što je veoma značajno za luminescentnu diskriminaciju tkiva. Takođe, u poređenju sa običnim emisijom spektrom, sinhroni spektar je daleko informativniji. Može se reći da sinhroni spektar određenog uzorka predstavlja njegov “otisak” (fingerprint) jer je jedinstven za dati uzorak. Poređenjem sinhronih spektara dva slična sistema moguće je odmah definisati razlike između njihovih komponenta (Dubayova, 2003). Vo-Dinh (Vo-Dinh, 2000) je prvi primenio sinhronu spektroskopiju na tkivu. Zatim je ova metoda uspešno primenjena u dijagnostici kancera grla (Majumder, 2000), kao i u diskriminaciji zdravog

i malignog tkiva dojke (Dramićanin, 2005; Dramićanin, 2006; Dramićanin, 2011). Takođe, pokazano je da je sinhronom luminescentnom spektroskopijom moguće dijagnostikovati kancer materice (Ebenezar, 2010).

Trodimenzionalna sinhrona luminescentna spektroskopija (3DSLS) je modifikovana sinhrona luminescentna spektroskopija kod koje termin trodimenzionalnost prodrzumeva oblast definisanu eksitacionom talasnom dužinom, emisionom talasnom dužinom i intenzitetom emisije. Ovom metodom dobija se serija sinhronih spektara za različite sinhronne intervale, što ovu metodu čini veoma korisnom u analizi višekomponentnih sistema (Dramićanin, 2009). 3DSLS je optimizovana i uvedena u primenu na tkivu u istraživanju čiji je cilj bio uspostavljanje sigurnih kriterijuma za diskriminaciju zdravog i malignog tkiva dojke (Dramićanin, 2006a; Dramićanin, 2011).

1.11 Fluorofore

Fluorofore su molekuli kod kojih je apsorpcija svetlosti praćena emisijom u vidu fluorescencije. U heterogenim sistemima kao što je tkivo, na fluorescenciju tkiva utiču raspodela i koncentracija svih prisutnih fluorofora kao i biohemijske i biofizičke promene u njihovoj neposrednoj okolini. Svaka pojedinačna fluorofora ima jedinstven fluorescentni spektar u tačno definisanim uslovima okoline (pH, vlažnost, temperatura) i u precizno definisanim uslovima geometrije eksitacija-detekcija. Kada je reč o fluorescenciji tkiva, mogu se razlikovati dve vrste fluorofora: endogene i egzogene.

Endogene fluorofore su molekuli koji su gradivni elementi tkiva sa izraženim fluorescentnim svojstvima. Autofluorescentni procesi su svi procesi koji potiču od endogenih fluorofora. U endogene fluorofore se ubrajaju aromatične amino kiseline, strukturni proteini, lipidi, enzimi i koenzimi, vitamini i porfirini. Eksitacioni maksimumi pomenutih fluorofora se kreću u intervalu od 250-450 nm što obuhvata UV/VIS spektralni region, dok se emisioni maksimumi kreću u opsegu od 280-700 nm što pokriva UV/VIS/NIR spektralni region.

Najvažnije endogene fluorofore prisutne u humanoj koži koje mogu proizvesti luminescentni efekat su: triptofan, strukturni proteini kolagen i elastin, redukovana forma koenzima nikotin adenin dinukleotida (NADH) i flavin adenin dinukleotid (FAD) (Kolias, 2002). U tabeli 1.4 su prikazani eksitacioni i emisioni maksimumi pomenutih fluorofora.

Tabela 1.4 Eksitacioni i emisioni maksimumi endogenih fluorofora kože

Endogene fluorofore	Eksitacioni maksimum (nm)	Emisioni maksimum (nm)
Triptofan	295	340-350
Pepsin razgrađujući kolagen	335-340	380-390
Kolagenaza razgrađujući kolagen	365-380	420-440
Elastin	420	500
NADH	350	460
FAD	450	535

Triptofan pripada grupi aromatičnih aminokiselina. On se pobuđuje u UV oblasti (maksimum eksitacije je 295 nm), dok emituje u vidljivom delu spektra (maksimum emisije se kreće između 340 i 350 nm).

Kolagen i elastin su strukturni proteini kože. Fluorescentne osobine ovih proteina potiču od njihovog umrežavanja („cross-link“). U literaturi su opisani eksitaciono-emisioni maksimumi dve forme kolagena: pepsin razgrađujuće forme (*engl.* pepsin-digestible collagen cross-links) i kolagenaza razgrađujuće forme (*engl.* collagenase-digestible collagen cross-links) (Kolias, 2002; Sell, 1991; Odetti, 1992). Eksitacioni maksimumi pomenutih formi kolagena su oko 335 i 370 nm, dok emisioni maksimumi iznose oko 380 i 460 nm, respektivno. Fluorescencija elastina je slabije proučena zbog preklapanja sa emisionim maksimumima drugih fluorofora, što rezultuje

njegovim relativno slabim fluorescentnim odzivom (Banerjee, 1998). Elastin ima pobudu na 420 nm, dok emituje na 500 nm.

NADH i FAD su koenzimi koji u organizmu imaju ulogu prenosioca elektrona. Oksidovani oblici NAD^+ i FAD su primaoci elektrona koji se u procesu primanja elektrona redukuju u NADH i FADH_2 . Zatim se elektroni prenose na O_2 a oni se vraćaju u oksidovani oblik. Fluorescentni oblici ova dva koenzima su NADH (Lakowicz, 1985) i FAD (Masters, 1993). Eksitacija NADH je u ultraljubičastoj oblasti, dok je za FAD u vidljivoj oblasti.

Fluorofore kože se uglavnom pobuđuju u ultraljubičastom delu spektra i skoro je nemoguće razdvojiti njihove preklapajuće apsorpcione trake. Osim toga, veliki broj hromofora kože koje nemaju fluorescentna svojstva apsorbuju svetlost u ultraljubičastom regionu. Glavne UV apsorbujuće hromofore kože su melanin i hemoglobin (300-400 nm) dok na kraćim talasnim dužinama proteini postaju dominantne apsorbujuće hromofore (280-330 nm). Takođe, apsorpcija svetlosti u pomenutom regionu potiče i od drugih molekula kože kao što su: nukleinske kiseline (DNA i RNA), NAD/NADH, urokanična kiselina itd. (Young, 1997). Važno je naglasiti da iako melanin intenzivno apsorbuje svetlost na talasnim dužinama ispod 330 nm, njegova apsorpcija je na nižoj talasnoj dužini u odnosu na apsorpciju proteina kože (Kolias, 1986).

Koža predstavlja sistem sa složenim optičkim osobinama. Iz tog razloga važan faktor koji treba uzeti u obzir je dubina prodiranja svetlosti kroz kožu. Literaturni podaci pokazuju da je dubina prodiranja svetlosti u kožu otprilike 1 mm u crvenom delu vidljivog spektra (700 nm), i opada otprilike za jedan red veličine u plavom delu vidljive oblasti (400 nm) (Kolias, 2002). Između 400 i 300 nm dubina prodiranja svetlosti opada još više, za otprilike dva reda veličine. Izvodi se zaključak da se na 700 nm može dobiti informacija iz svih slojeva kože, dok na 290 nm svetlost dopire do epidermisa kože.

Egzogene fluorofore su fotosenzitivna jedinjenja koja se unose u organizam u vidu kontrastnih sredstava. Neke egzogene fluorofore kao što su hematoporfirinski derivati (HpD), benzoporfirinski derivati (BpD) i ptalocijanin koriste se kao tumor markeri. Veliku primenu pronašle su u fotodinamičkoj terapiji (PTD) (Sidorff, 2010). PTD predstavlja terapijski metod koji se koristi za uništavanje malignog tkiva

aktivacijom unetog fotoosetljivog leka. Lek se putem kontrasta unosi intravenozno u organizam ili površinski (kožni tumori) i nagomilava se u tumorskom tkivu. Nakon direktnog osvetljavanja obolele regije, dolazi do aktivacije leka i uništavanja bolesnog tkiva.

U novije vreme se naročito u oblasti terapije kožnih kancera koristi egzogena fluorofora **δ -aminolevulinska kiselina** (5-ALA) koja nema fluorescentna svojstva. Međutim, 5-ALA je fotosenzitivni biohemijski prekursor **protoporfirina IX** (PpIX) koji fluorescira u tumorskom tkivu (Turrell, 2010). Vodeni rastvor 5-ALA se direktno ubrizgava u kožni tumor i nagomilava se kako u zdravim tako i u neoplastičnim ćelijama epidermisa. Zatim se fluorescentni biohemijski prekursor PpIX formira u mitohondrijama ovih ćelija. Razlike u PpIX kinetici između normalnih i malignih ćelija indukuju različite fluorescentne odzive ovih ćelija.

1.12 Optičke spektroskopske tehnike-difuzna refleksija

Difuzna refleksija i spektroskopija elastičnog rasejanja su neinvazivne metode kojima se meri prostiranje svetlosti kroz tkivo u cilju dobijanja informacija o biohemiji i morfologiji tkiva koje se mogu iskoristiti u analizi patologija različitih vrsta tkiva. Interakcija svetlosti sa tkivom kao i pojave apsorpcije, rasejanja ili refleksije svetlosti su objašnjene u odeljku 1.7. Difuzna refleksija je refleksija svetlosti od neravne površine kakva je površina tkiva. Svetlosni snop prolazi kroz površinu tkiva i biva rasejan ili apsorbovan u unutrašnjosti tkiva. U osnovi, samo deo svetlosti koja je rasejana u uzorku a zatim vraćena na površinu uzorka se smatra difuznom refleksijom. Svojstva takve svetlosti (npr. intenzitet na određenoj talasnoj dužini) zavise od strukturnih i biohemijskih osobina tkiva. Zbog toga je potencijal ove metode za dijagnostiku kanceroznih i prekanceroznih stanja veliki. Međutim, pravi potencijal difuzne refleksije još uvek nije u potpunosti iskorišćen zbog toga što veza između biologije tkiva i fizike prostiranja svetlosti do sada nije potpuno razjašnjena. Razumevanje prirode ove veze bi dosta pojednostavilo optimizaciju pomenute metode u cilju dobijanja što tačnijih i klinički značajnih informacija o ispitivanom tkivu.

1.13 Primena optičkih spektroskopskih metoda u biomedicinskoj dijagnostici

Optičke metode su poslednjih decenija doživele ekspanziju u raznim oblastima istraživanja naročito u oblasti dijagnostike patoloških stanja (Ramanujam, 2000; Kondepoti, 2008). Među njima, fluorescentna spektroskopija se pokazala kao izuzetno pogodna tehnika u onkološkoj praksi, posebno za ispitivanja različitih promena na tkivu (Ramanujam, 2000a). Glavne prednosti ove metode su njena velika osetljivost, pouzdanost, brzina i najvažnije neinvazivnost. Ova metoda se više fokusira na površinu tkiva, nego na njegovu zapreminu, te je pogodna za endoskopska ispitivanja tkiva.

Dijagnostički potencijal fluorescencije tkiva prvi je otkrio Stubel, početkom prošlog veka (Stubel, 1911). *In vitro* fluorescentna merenja različitih vrsta životinjskih i humanih tkiva vršena su u cilju što boljeg razumevanja interakcija između ćelija (Bottiroli, 1995). Rezultati ovih merenja predstavljali su dobru osnovu za *in vivo* ispitivanja različitih tkiva. Pioniri u oblasti fluorescentne spektroskopije Profio (Profio, 1977), Alfano (Alfano, 1987) i Yang (Yang, 1987), usmerili su svoja istraživanja na *ex vivo* i *in vivo* ispitivanja normalnog i neoplastičnog životinjskog i humanog tkiva. Pokazano je da fluorescentna spektroskopija ima veliki potencijal u dijagnostici kancera jer može da detektuje promene nastale kao posledica patoloških i metaboličkih tkivnih promena.

U novije vreme, *in vivo* spektroskopska istraživanja su fokusirana na oblast rane dijagnostike kancera. Veliki napredak u *in vivo* fluorescentnoj spektroskopiji omogućio je razvoj fluorescentne endoskopije kao posebne grane tkz. "optičke biopsije" (Alfano, 2013). Ona predstavlja zanimljivu oblast spektroskopije sa velikim potencijalom korišćenja neinvazivnih ili minimalno invazivnih metoda za dijagnostiku kancera u ranim fazama nastanka kao i praćenja razvoja istog. Osnovni princip ove metode podrazumeva da emisija i rasejanje svetlosti direktno potiču od sastavnih komponenti tkiva, tako da kod patoloških promena tkiva dolazi i do promena u sastavnim komponentama što rezultuje promenom emisije i rasejanja svetlosti u obolelom tkivu. Pored neinvazivnosti ili minimalne invazivnosti, optička biopsija omogućava brza merenja, što znači da je moguće izvršiti merenja u realnom vremenu. Takođe, optičkom biopsijom moguće je detektovati prekancerozna stanja čime se znatno povećava uspešnost izlečenja pacijenata.

Do danas, fluorescentna spektroskopska istraživanja su vršena na različitim vrstama tkiva, pre svega na kolonu (Dinish, 2007; Mayinger, 2003), plućima (Lucassen, 2013; Nakanishi, 2007), dojci (Palmer, 2003; Damićanin, 2005; Damićanin, 2006), materici (Freeberg, 2007; Ebenezar, 2010) i glaveno-vratnoj regiji (Heintzelman, 2000; Yuvaraj, 2014).

Kao što je ranije rečeno, u optičkom smislu koža je veoma složen medijum sastavljen od velikog broja molekula sa izraženim fluorescentnim svojstvima. Prva fluorescentna merenja kože pratila su fenomen starenja kože (Leffell, 1988). Zatim su usledila ispitivanja određenih kožnih promena kao što je crvenilo kože i psorijaza laser-indukovanom fluorescentnom spektroskopijom (Bissonnette, 1998). Takođe, fluorescentna spektroskopija je korišćena i za praćenje različitih dinamičkih procesa u koži (Kennedy, 1996).

Dve grupe istraživača objavile su kontradiktorne rezultate studija koje su se bazirale na upotrebi fluorescentne spektroskopije u dijagnostici kancera kože (Lohmann, 1988; Lohmann, 1989; Sterenborg, 1994). Naime, razlike u mišljenjima su se javile u objašnjenju dobijenih spektralnih odgovora kože, zbog činjenice da se koža sastoji od velikog broja fluorofora čiji se eksitacioni i emisioni pikovi preklapaju. Takođe, apsorpcione hromofore kože, prvenstveno melanin i hemoglobin, dosta utiču na intenzitet fluorescencije, što je naročito izraženo kada dolazi do intenzivnog preklapanja emisije trake fluorofora i apsorpcione trake hromofora.

In vivo fluorescentna spektroskopija uspešno je primenjena za diskriminaciju zdrave kože i nemelanomskih kancera kože (Brancaleon, 2001). Pokazano je da je kod bazocelularnog i planocelularnog tumora intenzitet emisije koji potiče od triptofana dosta veći u odnosu na intenzitet emisije zdrave kože, što je objašnjeno hiperproliferacijom tumorskih ćelija. Nasuprot tome, intenzitet fluorescencije koji potiče od kolagena i elastina dermisa je niži kod tumora nego kod zdrave kože. Moguće objašnjenje bi bilo da usled oslobađanja enzima kolagenaze prilikom transformacije zdravog tkiva u maligno dolazi do raskidanja unakrsnih veza kolagena i elastina tj. dolazi do degradacije vanćelijskog matriksa kože.

Koža predstavlja vrlo pristupačan organ za testiranje metoda kao što je difuzna refleksija. U tom smislu, prva refleksiona merenja kože bila su izvršena u cilju diskriminacije melanoma i pigmentnih kožnih lezija. Ona su bila koncentrisana na

apsorpcione osobine kože koje potiču od melanina i hemoglobina (Dawson, 1980). Rezultati ovih merenja poslužili su kao osnova za istraživanja koja su detaljno proučavala optičke osobine kože (Anderson, 1981).

U novije vreme, difuzna refleksija u kombinaciji sa fluorescentnom spektroskopijom je korišćena za identifikaciju tumora mozga (Lin, 2001). Na osnovu dobijenih podataka i korišćenjem dvostepenog diskriminacionog algoritma dobijena je senzitivnost od 100% i specifičnost od 76%.

2. CILJEVI

Ciljevi istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji su:

- ❖ da se identifikuju biostatistički značajne razlike u luminescentnim odgovorima pigmentnih kožnih lezija i zdrave kože koje bi poslužile za pouzdanu optičku detekciju kožnih tumora, čime bi se unapredila fundamentalna znanja o njihovom nastanku i progresiji
- ❖ da se metodama multivarijantne analize ustanove spektralne oblasti u kojima se uočavaju najznačajnije optičke razlike između zdrave kože, nevusa i melanoma i da se na osnovu tih podataka izgrade optimalni klasifikacioni modeli
- ❖ da se izvrši korelacija uočenih spektralnih razlika zdrave kože, nevusa i melanoma sa biohemijskim promenama u tkivu
- ❖ da se izvrši analiza mogućnosti modernih luminescentnih tehnika (sinhrone luminescentne spektroskopije i trodimenzionalne sinhrone luminescentne spektroskopije) za karakterizaciju tkiva; da se izvrši njihovo poredjenje, kao i da se odrede optimalni uslovi za njihovu primenu
- ❖ da se izvrši klasifikacija spektralnih podataka zdrave kože, nevusa i melanoma veštačkim neuronskim mrežama u cilju uspostavljanja automatizovane i objektivne metode za detekciju melanoma na osnovu luminescentnih spektara
- ❖ da se izvrši analiza mogućnosti difuzno refleksione spektroskopije za karakterizaciju svojstava kože, da se odrede optimalni uslovi za primenu ove metode, kao i da se odrede spektralne karakteristike koje bi poslužile za objektivno određivanje boje kože na osnovu refleksionih spektara.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Priprema uzorka

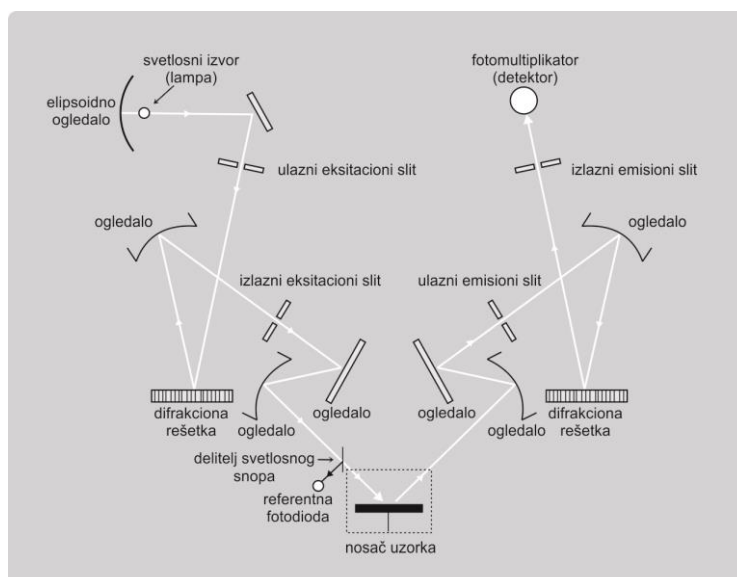
Prvi deo istraživanja vezanih za ovu doktorsku disertaciju sproveden je na 11 uzoraka uzetih od pacijenata obolelih od melanoma, 15 uzoraka nevusa i 22 uzoraka zdrave kože (30 žena i 18 muškaraca). Starost pacijenata kretala se od 20 do 85 godina (prosečna vrednost 42 godine). Uzorci melanoma, nevusa i zdrave kože dobijeni su iz Instituta za ortopedsko-hirurške bolesti „Banjica“ u Beogradu. Uzorci su odabrani nakon kliničkog i dermoskopskog pregleda i odmah nakon operacije su odloženi u fiziološki rastvor i čuvani na 4°C do luminescentnih merenja. Veličina uzoraka je varirala od 0,5×0,5×0,5 cm do 1,5×1,0×1,0 cm. Uzorci su pričvršćeni na kvarcno staklo i namešteni u specijalni držač u spektrofleurimetru.

Svi uzorci su histopatološki okarakterisani i prema datom nalazu klasifikovani. Ispitivane kožne lezije su locirane na rukama (11 slučajeva; 22,92%), nogama (10 slučajeva; 20,83%), stomaku (15 slučajeva; 31,25 %) i glaveno-vratnom regionu (12 slučajeva; 25%) pacijenata. Četiri (36,36%) od klasifikovanih 11 melanoma su bili melanomi *in situ*, dok preostalih 7 (63,64%) su bili invazivni. Prosečna vrednost debljine 7 invazivnih melanoma iznosila je 0,64 mm (opseg od 0,2 do 3,1 mm). Od ukupno 15 klasifikovanih nemelanomskih kožnih lezija 13 (86,67%) su okarakterisane kao obični mladeži, a preostale 2 (13,33%) su bili blue nevusi.

Drugi deo istraživanja sastojao se od *in vivo* merenja kože 105 volontera (49 žena i 56 muškaraca). Volonteri su klasifikovani po tipu kože (Ficpatrikov sistem klasifikacije fototipova kože; I-VI), starosnoj grupi (I do 30 godina; II od 30 do 60 godina i III od 60 godina) i polu (muškarci i žene). Merenja difuzne refleksije kože volontera su izvršena na dve regije tela: čelu (31 žena i 43 muškaraca) i šaci (18 žena i 13 muškaraca).

3.2 Merenje sinhronne luminescencije

Merenja uzoraka melanoma, nevusa i zdrave kože su izvršena na komercijalnom fluorescentnom spektrometru (Perkin Elmer, LS 45) koji je šematski prikazan na slici 3.1. Kao što je na šemi prikazano, izvor pobude u ovom instrumentu je impulsna ksenonska lampa koja emituje svetlost i usmerava je na ulazni prorez monohromatora preko posebnog sistema ogledala. Zatim svetlost iz monohromatora biva usmerena na difrakcionu rešetku i kao rezultat interferencije na rešetki nastaje monohromatska svetlost određene talasne dužine, koja se posebnim sistemom ogledala, preko izlaznog proreza izvodi iz monohromatora. Takva svetlost biva usmerena na deo uređaja koji se zove delitelj svetlosnog snopa, koji jedan deo svetlosti usmerava na referentni uzorak čime se automatski koriguje intenzitet pobudne svetlosti. Drugi deo svetlosti usmerava se ka uzorku koji se nalazi na specijalnom držaču (holderu). Sa uzorka se svetlost sakuplja na ogledalo koje je postavljeno pod uglom od 90° i preko drugog monohromatora (emisionog) se usmerava na detektor. Opseg rada oba monohromatora kreće se od 200 do 800 nm, dok se za detekciju emisionog signala koristi fotomultiplikatorska cev (Hamamatsu R928).

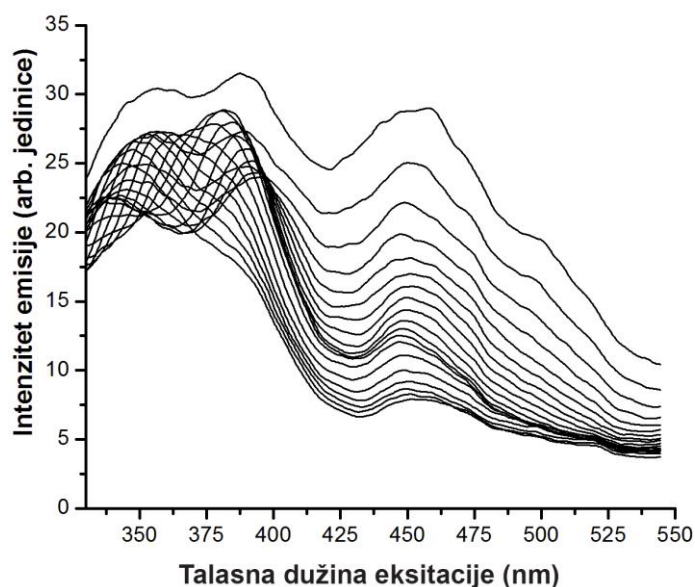


Slika 3.1. Šematski prikaz spektrofotometra LS45

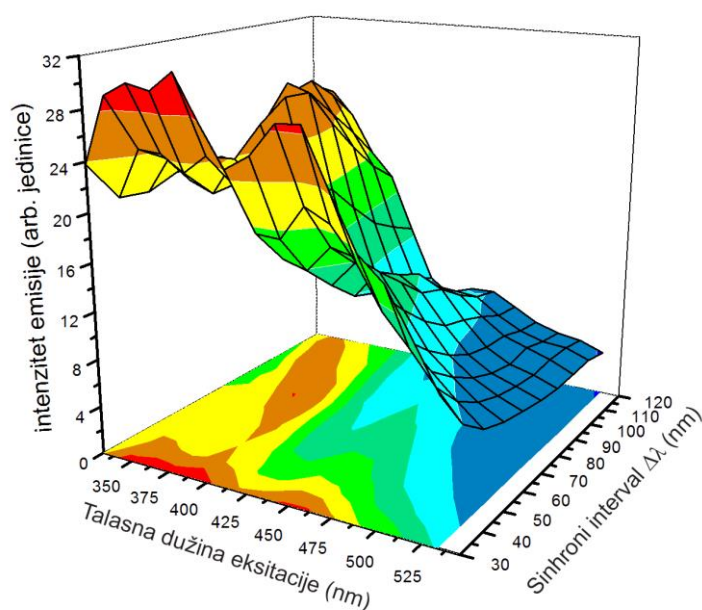
Uzorci melanoma, nevusa i zdrave kože analizirani su sinhronom luminescentnom spektroskopijom kao i trodimenzionalnom SLS. Za obradu rezultata korišćeni su programski paketi Origin 7.0; Solo verzija 6.5.4 (Eigenvector Inc., Chelan, WA, USA) i Matlab R2012a. Svi eksperimentalni rezultati su obrađeni metodama multivarijantne analize.

3.2.1 Sinhroni luminescentni spektri

Trodimenzijski sinhroni luminescentni spektri melanoma, nevusa i zdrave kože su snimljeni na Perkin Elmer-ovom spektrofotometru LS45 uz konstantno rastojanje talasne dužine između eksitacije i emisije koje se kretalo od 30 do 120 nm. Brzina snimanja spektara iznosila je 200 nm/min, dok se eksitacioni interval kretao od 330 do 545 nm sa korakom snimanja sinhronog intervala od 5 nm, što znači da je izmereno 19 sinhronih spektara za svaki uzorak. Izmereni spektri su automatski korigovani na intenzitet pobude korišćenjem referentne fotodiode. Izgled sirovih nenormalizovanih sinhronih spektara jednog uzorka zdrave kože prikazan je na slici 3.2., dok je na slici 3.3. dat izgled trodimenzionalnih SL spektara (3DSL) istog uzorka.



Slika3.2. Nenormalizovani SL spektri jednog uzorka zdrave kože



Slika 3.3. Trodimenzionalni grafik nenormalizovanog 3DSL spektra jednog uzorka zdrave kože

Spektri su normalizovani tako da maksimum emisije ima vrednost 100. Normalizacija je neophodna zato što intenzitet fluorescencije tkiva dosta zavisi od uzorka tj. od njegove veličine, debljine pa i površine, te se ovim postupkom upravo omogućava uklanjanje ovog problema. Zatim je izvršeno usrednjavanje spektara za sve 3 grupe uzoraka kože, odnosno, za svaku grupu podataka izračunat je srednji spektar i prikazan je u obliku jednog spektra za melanom, nevus i zdravu kožu. Ovaj postupak je neophodan kako bi se uspostavili odgovarajući kriterijumi za diferencijaciju tkiva. Ovako dobijeni spektri predstavljeni su u formi konturnih dijagrama koji će biti prikazani u odeljku 4 (rezultati).

3.3 Merenja difuzne refleksije kože

Merenja difuzne refleksije kože su izvršena na spektrofleurimetru (Skin Skan Jobin Yvon) koji je prikazan na slici 3.4. Sastavni delovi ovog uređaja su: 125W kontinualna ksenonska lampa, dupli emisijski i eksitacioni monohromatori; optički kabl sastavljen od dva kabla koji se spajaju u jedan (fiber-optički kapler); referentni detektor (UV pojačana silikonska fotodioda) i emisijski detektor (tip R928P), osetljivost u opsegu od 180-840 nm). Princip rada spektrofleurimetra detaljno je opisan u odeljku 3.2. Korišćenjem fiber optičkog kabla kod ovog sistema omogućeno je da se izvrše *in vivo* merenja kože. Kako se pomenuti optički kabl sastoji od dva kabla koji se spajaju u jedan, kroz jedan kabl se dovodi pobudna svetlost na uzorak, dok se istovremeno emitovana svetlost sa istog dela uzorka drugim kablom dovodi do emisione grane spektrofleurimetra.

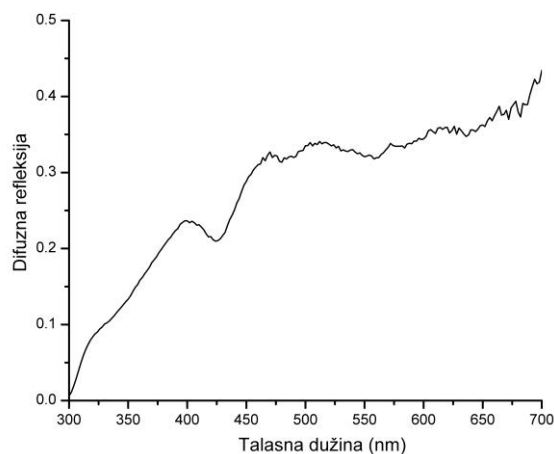


Slika 3.4. Skin Scan spektrofleurimetar

3.3.1 Difuzno-refleksioni spektri kože

Difuzno-refleksioni spektri kože su snimljeni na spektrofotometru (Skin Scan-Jobin Yvon) u sinhronom modu gde je sinhroni interval iznosio 0 (konstantno rastojanje između talasne dužine eksitacije i emisije je bilo 0; $\Delta\lambda=0$ nm). Spektri su izmereni u spektralnom regionu od 300 do 700 nm, sa korakom snimanja od 2 nm i integracionim vremenom od 0.2s. Spektar lampe je snimljen korišćenjem standarda za difuznu refleksiju. Dobijeni refleksioni spektar kože je podeljen sa dobijenim refleksionim spektrom dobijenim pomoću standarda kako bi se eliminisao spektar lampe. Sva merenja su izvršena *in vivo* korišćenjem fiber optičkog kabla na dve regije kože volontera: čelu i šaci. Pre svakog merenja ispitivana regija kože je očišćena 0,9% fiziološkim rastvorom.

Dobijeni rezultati su obrađeni metodom analize glavnih komponentata (PCA) dok je za određivanje boje kože korišćen $L^*a^*b^*$ sistem boja. Na slici 3.5. je dat izgled jednog difuzno refleksionog spektra koji je snimljen na čelu volontera koji je po Ficpatrikovoj klasifikaciji pripadao fototipu I.



Slika 3.5. Difuzno refleksioni spektar čela volontera (fototip I)

3.4 Multivarijantna analiza podataka

Multivarijantna analiza (*engl. Multivariate Analysis-MVA*) podataka predstavlja paralelno analiziranje svih dobijenih parametara u cilju što boljeg razumevanja njihovih međusobnih veza.

Model je skup najbitnijih ekstrahovanih informacija o sistemu koji se ispituje.

MVA se može podeliti u tri oblasti:

- ❖ **Eksploratorna analiza podataka** (*engl. Exploratory Data Analysis-EDA*)
- ❖ **Regresiona analiza**
- ❖ **Klasifikacija** (u cilju identifikacije novih ili postojećih klasa)

Korišćenjem svake od pomenutih metoda ponaosob mogu se uspešno analizirati podaci, ali se najbolji rezultati postižu kombinovanjem ovih metoda.

Multivarijantnom analizom moguće je identifikovati i izolovati parametre koji najviše doprinose ukupnoj varijabilnosti ispitivanih podataka. Takođe, multivarijantnom analizom omogućava se grafički pregled rezultata, što dodatno olakšava njihovu interpretaciju.

Neophodan korak u svakoj multivarijantnoj analizi je priprema podataka za analizu (predprocesiranje). Najčešće se koristi centriranje i skaliranje podataka. U osnovi dolazi do manipulacije kolona matrice sa ciljem da sve kolone imaju srednju vrednost nula (podaci centrirani srednjom vrednošću) i istu varijansu (skaliranje). U zavisnosti od vrste podataka često se primenjuje samo centriranje srednjom vrednošću a ne i skaliranje, kao što je slučaj sa svim spektralnim podacima (oni se nikada ne skaliraju). Ovim postupkom se dosta pojednostavljaju metode multivarijantne analize. U ovoj disertaciji korišćen je samo metod centriranja srednjom vrednošću jer su podaci bili istog reda veličine i merne jedinice. Takođe pre centriranja srednjom vrednošću, svi podaci su bili normalizovani što je prethodno opisano (odjeljak 3.2.1).

Pored pripreme podataka, bitan korak u multivarijantnoj analizi je validacija (testiranje) dobijenog modela. Osnovne prednosti validacije su: dobijanje najjednostavnijeg i pouzdanog modela; definisanje uzoraka koji najviše utiču na model; bolja interpretacija modela; potvrda da je najveća varijabilnost podataka opisana modelom (baziranog na osnovu seta podataka za obuku (training set)). Model se može

testirati na nekoliko načina kao što su *unakrsna validacija* (engl. cross-validation) ili *test set validacija*. Unakrsnom validacijom definisani setovi uzoraka se izostavljaju iz procesa pravljenja modela, dok se model pravi od preostalih uzoraka. Izostavljeni uzorci se kasnije koriste za proveru uspešnosti modela. Ovaj proces se ponavlja više puta sa različitom kombinacijom uzoraka. *Metoda preklapanja* (engl. venetian blinds) predstavlja tip validacije u kojoj se selektuje svaki n -ti uzorak iz seta podataka na taj način što se napravi n podela podataka tako da se svi uzorci izuzmu tačno jednom. Ova metoda je jednostavna i laka za primenu u slučaju kada postoji relativno veliki broj uzoraka kod kojih nije utvrđena određena pravilnost u redosledu.

Danas se multivarijantna analiza koristi u različitim oblastima istraživanja kao što su farmacija i biotehnologija, industrija hrane, poljoprivreda, itd. Ovaj tip analize je posebno pogodan za ispitivanje podataka dobijenih različitim spektroskopskim metodama.

3.5 Eksploratorna analiza podataka

Eksploratorna analiza podataka (EDA) predstavlja vrlo efikasan metod za ekstrakciju informacija iz velike grupe podataka. Ovom analizom moguće je pronaći “skriveni trend“ u kompleksnom setu podataka koji se teško uočava drugim analizama. Ekstrakcijom te vrste informacija omogućava se definisanje značajnih obrazaca grupisanja na osnovu kojih je moguće izvršiti klasifikaciju grupa sa sličnim karakteristikama. Kako između uzoraka i parametara uvek postoji zavisnost, EDA omogućava određivanje značajnosti parametara koji se koriste pri opisivanju merenih uzoraka u cilju što boljeg razumevanja datog sistema.

Eksploratorna analiza podataka se može podeliti na dve vrste analiza:

- ❖ **Klaster analiza** (služi za razdvajanje objekata u grupe-klastere, gde su članovi jedne grupe međusobno slični)
- ❖ **Analiza glavnih komponenata**

3.5.1 Analiza glavnih komponentata

Analiza glavnih komponentata (*engl. Principal Component Analysis-PCA*) predstavlja analizu varijabilnosti određenog seta podataka. PCA omogućava detaljan grafički prikaz podataka u cilju boljeg razumevanja veze između uzoraka i parametara. Ova metoda se vrlo uspešno primenjuje i daje odlične rezultate u situacijama kada se meri veliki broj parametara na puno uzoraka. PCA je našla veliku primenu u industriji i različitim oblastima naučnih istraživanja. Korišćenjem PCA moguće je klasifikovati nove genomske sekvence iz hromatografskih podataka ili identifikovati novi materijal analiziranjem spektroskopskih podataka.

PCA može da da odgovor na sledeća pitanja:

- Zašto se određeni uzorci grupišu zajedno?
- Zašto se različite grupe (klasteri) razdvajaju?
- Koji se trendovi uočavaju među uzorcima?
- Da li zaista postoji informacija u setu podataka?

Osnovni princip rada PCA je transformisanje podataka u tkz. „**glavne komponente**“ (*engl. principal components-PCs*) tako da svaka komponenta doprinosi objašnjenju ukupne varijabilnosti sistema, dok prva glavna komponenta predstavlja izvor najveće varijabilnosti među podacima. Glavnom komponentom (PC) se definiše parametar koji najviše doprinosi varijabilnosti sistema. Takođe, pokazuje se koji su parametri međusobno u korelaciji, kao i da li određeni set parametara opisuje značajnu strukturu ili je u pitanju samo šum (random noise). Osnovni cilj PCA je da se pri kombinovanju svih glavnih komponentata ekstrahuje što više informacija iz datog sistema podataka u što manjem broju glavnih komponentata, a što ostane pripisuje se šumu (noise). Znači, osnovni princip rada PCA se može definisati sledećom jednačinom:

$$\text{PODACI} = \text{INFORMACIJA} + \text{ŠUM (NOISE)}$$

U ovom slučaju informacija je definisana glavnim komponentama, dok je šum ono što je preostalo od podataka, što zapravo znači da set podataka predstavlja sumu glavnih komponentata i šuma. Kako bi se bolje razumeo pomenuti koncept, PCA daje detaljan grafički prikaz u vidu dve mape: „*score plot*“ koji predstavlja mapu uzoraka i „*loading plot*“ koji daje mapu parametara (koeficijenata). Broj glavnih komponenti se određuje na osnovu kumulativne varijanse komponentata koja ne sme biti manja od 50%, dok je optimalno da bude preko 90%. Pažljivom interpretacijom izračunatih komponenti mogu se otkriti „trendovi“ ili skrivene strukture u analiziranim podacima koje su povezane sa fenomenom koji se ispituje.

Prednost ove analize je mogućnost kompresije multivarijantnih podataka bez velikog gubitka informacija, što doprinosi pojednostavljenju numeričkih problema omogućavajući lakšu vizualizaciju i interpretaciju podataka pomoću grafika rasutosti (*engl.* scatter plot). Takođe, smanjenje dimenzija podataka koristi se u cilju razdvajanja značajnih informacija sadržanih u podacima (opisanih pomoću nekoliko latentnih varijabli) od onih koje su manje bitne.

U ovom radu, pre PCA analize, normalizovani podaci su centrirani u odnosu na srednju vrednost što je objašnjeno u odeljku 3.4. Na osnovu matrica sačinjenih od ulaznih podataka ($48 \text{ uzoraka} \times 431 \text{ talasna dužina}$) PCA modeli su izgrađeni i korišćeni u daljoj analizi podataka. Za svaki PCA model, dobijene su „*score*“ i „*loading*“ matrice. Score matrica ($48 \text{ uzoraka} \times \text{broj glavnih komponenti}$) sadrži koordinate svakog uzorka u novom koordinatnom sistemu glavnih komponenti. Loading matrica ($\text{broj glavnih komponenti} \times 431 \text{ talasna dužina}$) opisuje doprinos svakog ulaznog parametra (za svaku talasnu dužinu) glavnim komponentama. Zatim je izračunat procenat kumulativne varijanse iz ulaznog seta podataka za svaku glavnu komponentu. Broj glavnih komponenti u modelima je varirao u opsegu od 4 do 6, u skladu sa procentom kumulativne varijanse od 95%.

3.6 Klasifikacija

Klasifikacija predstavlja sortiranje grupe objekata u jednu ili više grupa na osnovu njihovih specifičnih karakteristika. Razlikuju se dva načina klasifikacije: **nenadgledani** (*engl. unsupervised*) i **nadgledani** (*engl. supervised*).

Nenadgledana klasifikacija podrazumeva građenje klasifikacionog modela bez informacije o tome kojoj grupi svaki uzorak pripada, već se model oslanja samo na izmerene parametre i međusobne sličnosti uzoraka. *Nenadgledana klasifikacija* predstavlja prvi korak u rešavanju određenog klasifikacionog problema. Ukoliko se grupe ne definišu dovoljno dobro ovom metodom, onda se pristupa *nadgledanoj klasifikaciji* kojom se definišu pravila za buduće klasifikacije novih uzoraka pri čemu je algoritmu poznata klasna pripadnost uzorka. Diskriminantna analiza vrši nadgledano klasifikovanje podataka u kojoj se koriste diskriminantna pravila za klasifikaciju novih uzoraka. U klasifikacionoj analizi danas se koriste različite metode:

- ❖ Linearna diskriminantna analiza
- ❖ Diskriminantna analiza parcijalno najmanjih kvadrata
- ❖ Metoda potpornih vektora
- ❖ Veštačke neuronske mreže

Pomenute metode danas se rutinski koriste kako u industriji tako i u naučnim istraživanjima. U farmaceutskoj industriji klasifikacija se koristi za identifikaciju sirovih materijala, kao i za identifikaciju narkotika. Posebnu primenu ove metode su pronašle u klasifikaciji stadijuma određenih bolesti kao što su različite vrste tumora.

3.6.1 Linearna diskriminantna analiza

Linearna diskriminantna analiza (*engl.* Linear discriminant analysis-LDA) je metod koji se koristi za pronalaženje jedne ili više linearnih funkcija (latentne linearne varijable) u datom setu podataka koja služi za razdvajanje dve ili više grupa. Ovaj metod nije efikasan za analizu multidimenzionih podataka, stoga je neophodna redukcija dimenzionalnosti unetih podataka (Varmuza, 2009).

Ova metoda se vrlo uspešno koristi u slučajevima kada postoje različite varijacije između klasa koje se analiziraju nasumično izabranim test podacima. Primenom LDA se naglašavaju varijanse između klasa u odnosu na varijanse koje postoje unutar klasa za određeni set podataka, čime se omogućava maksimalno razdvajanje grupa. Takođe, ova metoda pomaže u boljem razumevanju distribucije različitih svojstava analiziranih podataka (Fukunaga, 1990).

U LDA, setovi podataka mogu biti transformisani na dva načina: *klasno-zavisnom* transformacijom i *klasno-nezavisnom* transformacijom.

Klasno-zavisnom transformacijom se maksimalno povećava odnos varijanse između klasa u odnosu na varijansu unutar klasa, u cilju adekvatnog razdvajanja klasa. Transformacija setova podataka se postiže definisanjem dva optimalna kriterijuma. Klasno-nezavisnom transformacijom se maksimalno naglašava odnos ukupne varijanse u odnosu na varijansu unutar klasa i koristi se samo jedan kriterijum za transformaciju setova podataka. U ovom tipu LDA, svaka klasa se odvojeno posmatra u odnosu na sve ostale klase.

Velika prednost ove metode u odnosu na druge alternativne metode je njena jednostavnost, što znači da za optimizaciju podataka nije potrebna višestruka analiza. Takođe, ovom metodom se vrlo lako rešavaju problemi sistema podataka koji sadrže više od dve klase.

Kao što je već rečeno u ovoj disertaciji, redukcija dimenzionalnosti podataka postignuta je primenom PCA analize, i dobijeni rezultati su korišćeni za LDA. Ova analiza je urađena da se definiše sinhroni interval u kome je postignuto najbolje razdvajanje između grupa. Za evaluaciju LDA modela korišćene su dobijene klasifikacione greške. U ovoj studiji, za validaciju je upotrebljen ranije pomenuti metod

preklapanja (*engl.* venetian blinds). Napravljene su tri različite kombinacije setova podataka, gde je svaki set podeljen na dva dela; jedan deo seta podataka (dve trećine od broja uzoraka) je korišćen kao set podataka za obuku, dok su ostali podaci (preostala jedna trećina uzoraka) iskorišćeni za validaciju modela.

3.6.2 Diskriminantna analiza parcijalno najmanjih kvadrata

Diskriminantna analiza parcijalno najmanjih kvadrata (*engl.* Partial least squares discriminant analysis - **PLS-DA**) je praktična metoda koja se koristi za pravljenje diskriminantnih modela. Prednost ove metode je njena primena za klasifikaciju višedimenzionih podataka. Ova metoda se bazira na regresiji parcijalno najmanjih kvadrata, kojom se posmatrani podaci transformišu u set od nekoliko linearno usrednjenih parametara (PLS komponenti) koji se koriste za predikciju zavisne varijable. U PLS-DA, zavisna varijabila se naziva „*klasnom varijabilom*“, koja pokazuje da li dati uzorak pripada datoj klasi. Tako dobijen model se može koristiti da se predvidi klasa kojoj će pripadati novi uzorak. Da bi se odredio broj PLS komponenti koje se koriste u modelu, primenjuje se unakrsna validacija.

U ovom radu, PLS-DA modeli su napravljeni na osnovu PLS algoritma korišćenjem istih ulaznih podataka kao za PCA analizu. Pre proračuna modela bilo je neophodno definisati klase uzoraka i način validacije modela. Za validaciju ovog modela upotrebljena je prethodno opisana metoda preklapanja (venetian blinds). PLS-DA se sastoji iz više koraka analize. Prvo se latentna varijabila (LV) koja ima maksimum kovarijanse između skorova i predviđenih klasnih varijabila definiše kao prva komponenta. Zatim se varijansa prve komponente uklanja iz ulaznih podataka čime se redukuje unutrašnja dimenzionalnost za jedan. Dalje se preračunava druga komponenta koja ima maksimum kovarijanse između skorova i predviđenih klasnih varijabila. Ovaj proces se nastavlja sve dok se ne može postići dalja predikcija klasa. Broj komponenata u modelu se određuje na osnovu kalibracionih grešaka i grešaka unakrsne validacije dobijene korišćenjem modela za različiti broj latentnih varijabila. U ovom radu, broj latentnih varijabila se kretao u opsegu od 6 do 8, sa greškama između

2% do 10%. Svaki dobijeni klasifikacioni model je ocenjen analizom grešaka, krivom operativne karakteristike (*engl.* receiver operating characteristics (ROC) curve) i grafikom granične vrednosti modela (*engl.* threshold plot), koje PLS-DA algoritam daje kao izlazne podatke. ROC kriva grafički prikazuje učinak binarnog klasifikatora pri variranju vrednosti granice diskriminacije klasa, i pokazuje koliko dobro PLS-DA model razdvaja jednu grupu uzoraka od ostalih. Senzitivnost i specifičnost modela izračunata je za svaku vrednost praga diskriminacije. One postaju koordinatne tačke ROC krive. Kod teorijski perfektnog modela senzitivnost i specifičnost bi trebalo da imaju 100% vrednost, ali kako u praksi to nikada nije slučaj, uzima se da odličan model treba da ima vrednost površine ispod ROC krive između 0,9 i 1.

3.6.3 Metoda potpornih vektora

Metoda potpornih vektora (*engl.* **Support Vector Machine, SVM**) je statistički metod koji se može koristiti i za klasifikaciju i za regresiju. Prednost ove metode je mogućnost pravljenja efikasnog modela sa manjim brojem podataka za obuku (training set) u odnosu na druge metode kod kojih je veliki broj podataka neophodan, i što na nju ne utiče prisustvo autlajera (Burges, 1998). U osnovi, SVM transformiše originalni prostor podataka u višedimenzioni prostor gde se vrši linearno klasifikovanje grupa. Budući da tačke ulaznih podataka mogu pripadati jednoj od dve klase, SVM pronalazi hiper ravan (*engl.* hyperplane) u transformiranom prostoru, grupišući najveći mogući broj tačaka jedne klase sa iste strane, dok se u isto vreme povećava rastojanje klasa od hiper ravni. Definisanjem optimalne razdvajajuće hiper ravni minimalizuje se rizik od loše klasifikacije kontrolnih podataka.

U ovoj disertaciji, izgrađeni su SVM modeli na osnovu seta podataka za obuku koji se sastojao od 32 uzoraka i testirani sa 16 uzoraka nepoznatih modelu. U cilju pronalaženja optimalnog SVM modela različiti podaci su bili korišćeni (celi spektri bez kompresije i glavne komponente dobijene PCA analizom).

3.6.4 Veštačke neuronske mreže

Veštačke neuronske mreže (*engl.* Artificial Neural Networks-ANN) predstavljaju sofisticirane tehnike modeliranja koje se bave rešavanjem raznih naučnih i inženjerskih problema u slučaju kada je potrebno analizirati kompleksne podatke. Ove mreže oponašaju biološke procese u mozgu i sastoje se od osnovnih elemenata procesiranja (veštačkih neurona) koji su međusobno povezani u arhitekturu mreže. Veštački neuron prima ulazne signale koji su analogni elektrohemijским impulsima i odgovara adekvatnim izlazom koji korespondira izlazu biološkog neurona. U suštini, veza između biološke i veštačke mreže se može objasniti time da u veštačkoj mreži telo (soma) neurona predstavlja čvor, razgranate ulazne strukture (dendroni) odgovaraju ulazu, aksoni neurona odgovaraju izlazu, dok sinapse predstavljaju težinski faktori. Podešavanjem vrednosti konekcija (težinskih faktora) između elemenata, veštačka neuronska mreža se može obučiti da obavi zadatu funkciju na takav način da se za izabrane ulazne podatke dobiju unapred definisani izlazni podaci. Veštačke neuronske mreže su našle primenu u gotovo svim naučnim oblastima istraživanja. Posebno praktičnu primenu veštačke neuronske mreže imaju u industriji, medicini, ekonomiji, itd. (Zupan, 1999).

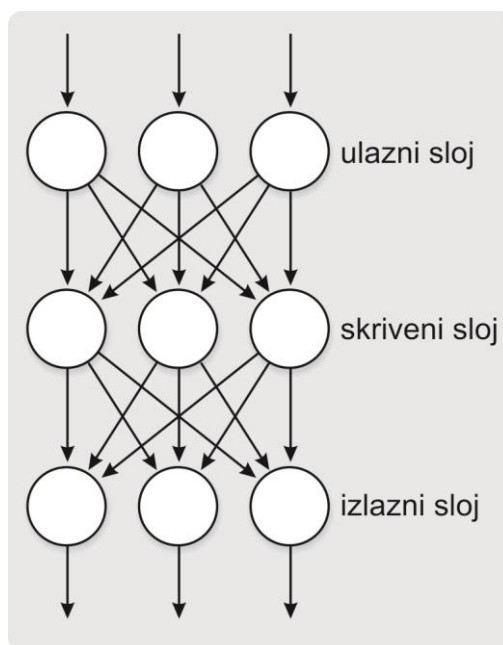
U ovoj disertaciji korišćene su dve vrste veštačkih neuronskih mreža: samoorganizujuće mape (SOM) i „feed-forward“ neuronske mreže.

Samoorganizujuće mape (*engl.* Self-organizing map-SOM) su jedne od najpopularnijih veštačkih neuronskih mreža koje pretvaraju višedimenzionalne nelinearne statističke veze u jednostavne geometrijske veze i nenadgledano se obučavaju. Ove mreže je u praksu uveo finski naučnik Teuvo Kohonen (Kohonen, 2001). Prednost ovih mreža je što su sposobne da nauče raspodelu i topologiju ulaznih veličina čime dobijaju mogućnost da kategorizuju ulazne podatke. Ova vrsta neuronskih mreža je najveću primenu našla u eksploratornoj analizi podataka (klaster analizi).

Samoorganizujuće mape najčešće imaju dvodimenzionu topologiju, mada mogu biti jednodimenzione, trodimenzione a ređe i višedimenzione. Oblici mreže zavise od neurona u mreži i njihovih međusobnih veza. Najčešće se koriste pravougaone i heksagonalne topologije kao i samoorganizujuće mape sa slučajnim nepravilnim

rasporedom neurona. U osnovi, samoorganizovane mape su organizovane na način da su svi neuroni u mreži direktno povezani sa ulaznim podacima, što znači da kada se na ulazu mreže pojavi vektor podataka svi neuroni u mreži automatski porede svoje težinske faktore sa elementima vektora. Zatim neuron čiji su težinski faktori najbližiji ulaznom vektoru prihvata vrednosti sa ulaza i usvaja ih kao svoje težinske faktore. Nakon toga neuroni koji su povezani sa izabranim neuronom adaptiraju svoje težinske faktore na osnovu već definisane funkcije učenja prihvatajući deo ulaznih vrednosti. Konstantnim unosom podataka za obuku prilagođavaju se vrednosti težinskih faktora neurona u mreži. Kada se završi proces obuke mreže, težinski faktori u neuronima određuju topologiju mreže koja odgovara ulaznim podacima, što zapravo znači da ako u ulaznim podacima postoji neka inherentna pravilnost ili korelacija, u obučenoj veštačkoj neuronskoj mreži se pojavljuju regioni sa specifičnim vrednostima težinskih faktora (klasteri). Velika prednost ovako organizovane mreže je potpuno odsustvo subjektivnog uticaja operatera na način formiranja klastera u mreži.

Višeslojni perceptron (*engl.* Multi layer feed-forward network, Multi layer perceptron (MLP)) predstavlja vrstu veštačkih neuronskih mreža kod koje su veštački neuroni organizovani u slojeve gde ne postoji veza između neurona u istom sloju, kao ni povratna veza sa prethodnim slojem (Thakur, 2011) i vrši se nadgledano obučavanje. MLP mreže se koriste za rešavanje širokog spektra problema gde se uz primenu algoritma s povratnom propagacijom greške vrši nadgledano učenje. Osnovna karakteristika ove mreže je dobra povezanost između veštačkih neurona (ima puno konekcija). Takođe, ona sadrži jedan ili više skrivenih slojeva neurona (slika 3.6.). Skriveni slojevi značajno povećavaju kapacitet učenja ove mreže. Navedene karakteristike predstavljaju osnovu uspešne primene ove mreže, ali postoje i određene mane. One podrazumevaju da se korišćenjem skrivenih neurona znatno otežava vizuelizacija procesa učenja. Takođe, proces učenja je teži zbog velikog broja veštačkih neurona i zbog potrebe da mreža sama odluči šta treba da nauče skriveni neuroni (za izlazne neurone se zna).



Slika 3.6. Šematski prikaz topologije jedne MLP mreže

Razlikuju se dva načina rada MLP mreža: mod za obuku (*engl.* training mode) i predikcioni mod (*engl.* prediction mode). Za oba načina rada potrebna su dva seta podataka: set podataka za obuku i set podataka za testiranje (test set).

Obučavanje mreže započinje povezivanjem težinskih faktora veštačkih neurona sa elementima vektora podataka za obuku. Svaka iteracija kompletnog seta podataka za obuku se naziva epoha. U svakoj epohi, mreža podešava vrednosti težinskih faktora u cilju smanjenja greške. Obično je potrebno dosta epoha da bi se završila obuka mreže. U predikcionom načinu rada, informacije se prenose kroz mrežu od ulaza ka izlazu. Mreža obrađuje pojedinačno informaciju, definišući izlazne vrednosti na osnovu vrednosti ulaznih podataka. Dobijena vrednost klasifikacione greške služi za procenu kvaliteta predikcije obučene mreže.

Prednost korišćenja MLP mreže se ogleda u njenoj sposobnosti “učenja” bez pomoći operatera. Međutim, veliki problem predstavlja činjenica da su procesi koji se dešavaju tokom obučavanja mreže još uvek nedovoljno razjašnjeni (Svozil, 1997).

Takođe, obično je broj težinskih faktora u mreži veliki i proces obuke mreže traje prilično dugo.

Kao što je već ranije pomenuto, da bi se smanjila dimenzionalnost dobijenih spektralnih podataka primenjena je PCA analiza. Za obučavanje obe mreže kao podaci za obuku su korišćene izračunate PCA komponente. Da bi se proverila uspešnost dobijenih klasifikacionih modela, mreže su testirane sa nepoznatim podacima. Obrada podataka urađena je u programu Matlab R2012a.

3.7 $L^*a^*b^*$ sistem za određivanje boje kože

Ljudsko oko može da prepozna deo vidljivog dela spektra u opsegu od 400 nm do 700 nm. Ono poseduje tri vrste receptora koji se razlikuju u spektralnoj senzitivnosti. Jedan tip receptora je naročito osetljiv na crveno-narandžastu nijansu boja, dok su drugi i treći više osetljivi na zelene i plave boje. Pri interakciji objekta sa svetlošću deo svetlosti se apsorbuje dok se preostali deo reflektuje. Reflektovana svetlost u ljudskom oku biva prepoznata kao boja (Byrne, 1997).

$L^*a^*b^*$ sistem boja, preporučen od Međunarodne komisije za osvetljenje (Commission Internationale de L'Eclairage (CIE)), predstavlja standardni sistem za definisanje boja u kome su boje raspoređene u trodimenzionalnom prostoru (MacAdam, 1997). U $L^*a^*b^*$ sistemu L^* parametar označava osvetljenost, b^* predstavlja nijanse boja od plave do žute ($-b^*$ do $+b^*$), dok a^* označava nijanse boja od zelene do crvene ($-a^*$ do $+a^*$). Pokazano je da je $L^*a^*b^*$ sistem naročito pogodan za ocenjivanje boje kože (Queille-Roussel, 1991).

XYZ tristimulusne vrednosti čine temelj CIE sistema boja. Koncept za XYZ tristimulusne vrednosti zasniva se na tri komponente teorije raspoznavanja boja, koji tvrdi da oko poseduje receptore za tri primarne boje (crvena, zelena i plava) i da se sve boje vide kao mešavina te tri primarne boje. XYZ tristimulusne vrednosti se računaju pomoću "Standard Observer" funkcija za definisanje boja iz refleksionog spektra (Lukas, 2007). Kako je teško vizualizovati boje uz pomoć XYZ vrednosti one se transformišu u $L^*a^*b^*$ parametre uz primenu definisanih matematičkih operacija.

U ovoj tezi za proračun XYZ tristimulusnih vrednosti je korišćen D65 standardni iluminant kao i tristimulusni standard za spektralne karakteristike ljudskog oka.

XYZ tristimulusne vrednosti se izračunavaju pomoću sledećih formula:

$$X = \frac{1}{N} \sum_i \bar{x}_i S_i I_i \quad Y = \frac{1}{N} \sum_i \bar{y}_i S_i I_i \quad Z = \frac{1}{N} \sum_i \bar{z}_i S_i I_i$$

$$N = \sum_i \bar{y}_i I_i$$

U ovim jednačinama **S** predstavlja vrednost difuzne refleksije, **I** je D65 standardni iluminant, dok \bar{x}_i \bar{y}_i i \bar{z}_i označavaju standard za oko tri stimulus.

Kada su izračunate XYZ tristimulusne vrednosti vrši se njihova transformacija u L*a*b* sistem. Ova transformacija zahteva standardne vrednosti za referentnu belu boju (X_r , Y_r , Z_r). Parametri L*a*b* se računaju pomoću sledećih jednačina:

$$L = 116f_y - 16 \quad a = 500 \cdot (f_x - f_y) \quad b = 200 \cdot (f_y - f_z)$$

$$f_x = \begin{cases} \sqrt[3]{x_r} & x_r > 0.008856 \\ \frac{kx_r + 16}{116} & x_r \leq 0.008856 \end{cases}$$

$$f_y = \begin{cases} \sqrt[3]{y_r} & y_r > 0.008856 \\ \frac{ky_r + 16}{116} & y_r \leq 0.008856 \end{cases}$$

$$f_z = \begin{cases} \sqrt[3]{z_r} & z_r > 0.008856 \\ \frac{kz_r + 16}{116} & z_r \leq 0.008856 \end{cases}$$

$$x_r = \frac{X}{X_r} \quad y_r = \frac{Y}{Y_r} \quad z_r = \frac{Z}{Z_r}$$

4. REZULTATI

Istraživanja vezana za ovu doktorsku disertaciju obavljena su u Laboratoriji za radijacionu hemiju i fiziku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ u saradnji sa Institutom za ortopedsko-hirurške bolesti „Banjica“ iz Beograda. Eksperimentalni deo ovog rada podeljen je na dva dela. Prvi deo su činila merenja sinhronih spektara na 11 uzoraka uzetih od pacijenata obolelih od melanoma, 15 uzoraka nevusa i 22 uzoraka zdrave kože. Svi uzorci su histopatološki okarakterisani i prema dobijenom nalazu klasifikovani.

Za analizu optičkih svojstava zdrave kože i pigmentnih promena na koži korišćene su dve spektroskopske tehnike:

- Trodimenzionalna sinhrona luminescentna spektroskopija (3DSLS)
- Klasična sinhrona luminescentna spektroskopija

Za obe spektroskopske tehnike utvrđene su spektralne oblasti u kojima su razlike u luminescentnim svojstvima zdrave kože i pigmentnih lezija najviše izražene. Intenzitet luminescencije tkiva u ovim oblastima analiziran je sa aspekta mogućeg uspostavljanja kriterijuma za diskriminaciju melanoma, nevusa i zdrave kože. Iz tog razloga izvršena je selekcija sinhronih luminescentnih spektara sa najviše razlika između pomenutih grupa korišćenjem multivarijantnih analiza podataka. Dobijene spektralne karakteristike poslužile su kao parametri u diskriminaciji melanoma, nevusa i zdrave kože sinhronom luminescentnom spektroskopijom.

U sledećoj fazi rada korišćeno je pet statističkih metoda (LDA, PLS-DA, SVM, SOM i MLP) u cilju klasifikacije dobijenih podataka za melanom, nevus i zdravu kožu. Osnovna ideja je bilo pronalaženje najoptimalnijeg klasifikacionog modela za diskriminaciju zdrave kože i pigmentnih kožnih lezija.

Drugi deo eksperimentalnog rada sastojao se od *in vivo* merenja difuzne refleksije kože 105 volontera. Volonteri su klasifikovani po tipu kože, starosti i polu. Dobijeni spektri su analizirani metodom glavnih komponentata (PCA) i $L^*a^*b^*$ sistemom za određivanje boje kože.

4.1 Sinhrona luminescentna spektroskopija

U prvom delu biće predstavljeni rezultati merenja sinhronne luminescencije na uzorcima melanoma, nevusa i zdrave kože koji su podeljeni u dve grupe:

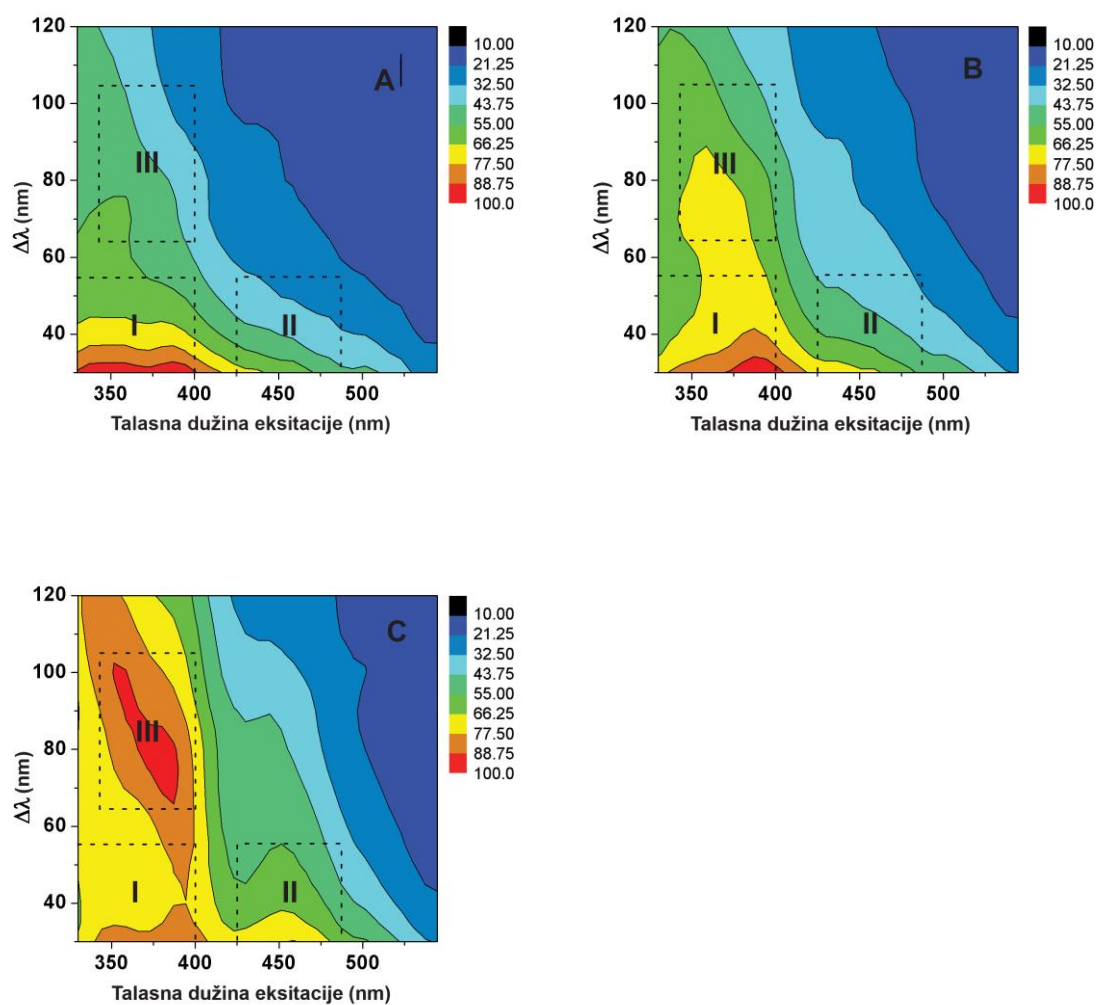
- Trodimenzionalni sinhroni luminescentni spektri (**3DSL spektri**) i
- Sinhroni luminescentni spektri (**SL spektri**)

Sinhrona luminescentna spektroskopija (SLS) je relativno nova luminescentna tehnika kod koje se sinhrono menjaju talasna dužina eksitacije i emisije detekcije pri čemu se održava konstantnim interval između njih. Trodimenzionalna SLS je modifikovana tehnika kod koje se dobija serija sinhronih spektara za različite sinhronne intervale, što ovu metodu čini veoma korisnom u analizi višekomponentnih sistema kao što su tkiva.

4.1.1 Trodimenzionalni sinhroni luminescentni spektri

Trodimenzijski sinhroni luminescentni spektri (3DSL) su snimljeni uz konstantno rastojanje talasne dužine između eksitacije i emisije koje se kretalo od 30 nm do 120 nm. Izmereni spektri su automatski korigovani na intenzitet pobude korišćenjem referentnog fotomultiplikatora. Takođe, svi spektri su normalizovani tako da maksimum emisije ima vrednost 100.

Na slici 4.1. su prikazani konturni dijagrami usrednjenih sinhronih spektara dobijenih na 11 uzoraka melanoma, 15 uzoraka nevusa i 22 uzoraka zdrave kože. Mogu se uočiti značajne razlike u intenzitetu luminescentne emisije između melanoma (slika 4.1a), nevusa (slika 4.1b) i zdrave kože (slika 4.1c).



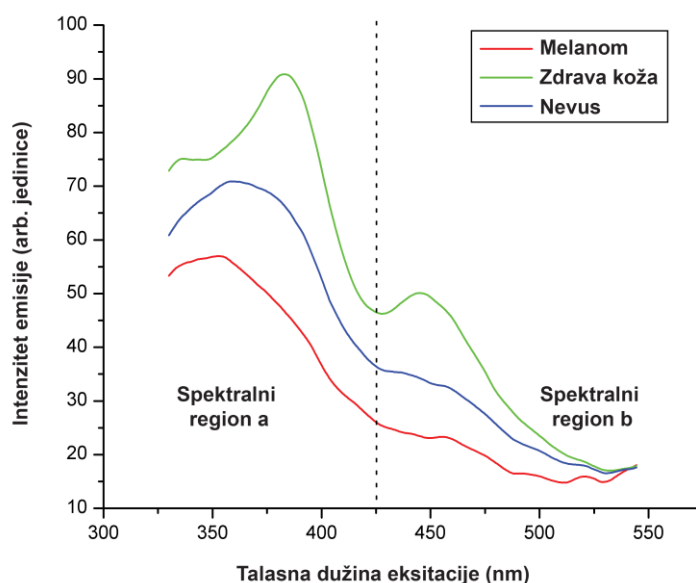
Slika 4.1. Trodimenzionalni sinhroni luminescentni konturni dijagrami a) usrednjeni sinhroni spektri 11 uzoraka melanoma, b) usrednjeni sinhroni spektri 15 uzoraka nevusa i c) usrednjeni sinhroni spektri 22 uzoraka zdrave kože

Osnovne razlike su vidljive u nekoliko spektralnih regiona:

- Prvi spektralni region (I) je lociran u eksitacionom opsegu od 330 do 400 nm i sinhronom intervalu od 30 do 55 nm. Naime, u tom regionu melanom i nevus imaju intenzivniju luminescenciju u odnosu na zdravu kožu. Takođe, morfologija spektara je veoma različita.
- Drugi spektralni region (II) je lociran od 425 do 480 nm eksitacionog opsega i od 30 do 55 nm sinhronog intervala. U ovom slučaju, zdrava koža pokazuje intenzivniji luminescentni odziv u odnosu na nevus i melanom mada ta razlika nije tako intenzivna kao u slučaju prvog spektralnog regiona.
- Treći spektralni region (III) se prostire od 340 do 400 nm eksitacionog opsega i od 65 do 105 nm sinhronog intervala. Ovde je evidentno da zdrava koža ima intenzivniji luminescentni odziv u odnosu na nevus i melanom, i uočava se znatna razlika u morfologiji konturnih 3DSL spektara.

4.1.2 Sinhroni luminescentni spektri

Iako 3DSL spektri melanoma, nevusa i zdrave kože sadrže sve neophodne spektralne karakteristike za diskriminaciju pomenutih lezija, primena ove tehnike u kliničkoj praksi je teško izvodljiva zbog dužine snimanja jednog takvog spektra koje traje u proseku oko sat vremena. Takođe, dodatno otežavajuća okolnost je što analiza svih dobijenih podataka traje određeno vreme. Iz ovih razloga, upotrebom klasične sinhronne luminescentne spektroskopije, tj. na osnovu obrađenih podataka dobijenih spektara, moguće je pronaći jedan sinhroni spektar koji pruža najviše podataka za diskriminaciju pomenutih tkiva. Na slici 4.2. je prikazan usrednjeni sinhroni luminescentni spektar za sinhroni interval 70 ($\Delta\lambda=70$ nm) za melanom, nevus i zdravu kožu.



Slika 4.2. Sinhroni luminescentni spektar uzet za sinhroni interval $\Delta\lambda=70$ nm; crvena linija predstavlja usrednjeni spektar 11 uzoraka melanoma; plava linija predstavlja usrednjeni spektar 15 uzoraka nevusa, a zelena linija predstavlja usrednjeni spektar 22 uzoraka zdrave kože

Može se primetiti da se emisioni pikovi nalaze u dva spektralna regiona i to od 350 do 425 nm (spektralni region a) i od 425 do 550 nm (spektralni region b) eksitacionog opsega. Takođe se može uočiti da je intenzitet fluorescencije najviši za normalnu kožu (zelena linija) a najniži za melanom (crvena linija).

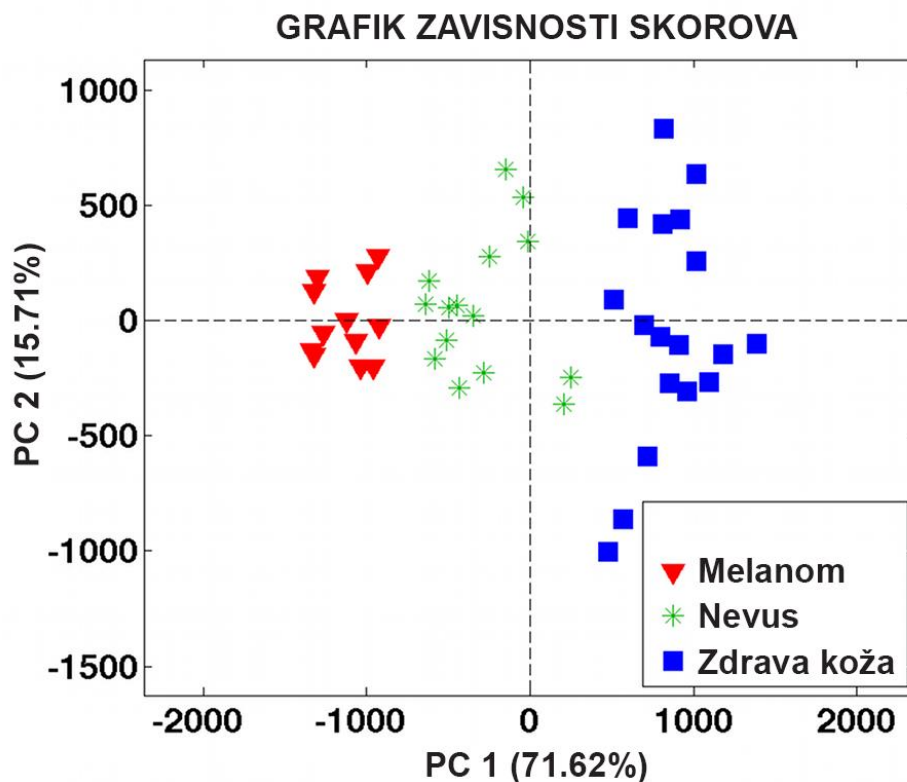
4.2 Selekcija sinhronih spektara analizom glavnih komponenata i linearnom diskriminantnom analizom

Razlike u spektralnim luminescentnim karakteristikama sinhronih spektara pigmentnih lezija i zdrave kože vizuelno gledano, mogle bi biti dovoljne za uspostavljanje kriterijuma za njihovu optičku diferencijaciju. Međutim, spektralne razlike koje su uočene na ovaj način nisu pouzdan kriterijum za dijagnostičku diskriminaciju melanoma, nevusa i zdrave kože. Stoga su primenjene metode multivarijantne analize u cilju preciznog i objektivnog definisanja spektralnih karakteristika pomenutih tkiva.

Analiza glavnih komponenata (PCA) je multivarijantna metoda koja služi za određivanje latentnih varijabli (komponentata). Ovom metodom je moguće analizirati i vizualizovati izmerene spektre, kao i izvršiti selekciju sinhronog intervala sa maksimumom varijanse između ispitivanih grupa kože. Takođe, ova analiza je izuzetno važna zato što su dobijeni spektri visokodimenzionalni podaci za koje je veoma teško odrediti korelacije bez prethodnog smanjenja dimenzionalnosti istih (Varmuza, 2009).

Kao što je objašnjeno u odeljku Materijal i metode (odeljak 3), pre PCA analize podaci su normalizovani a zatim su centrirani u odnosu na srednju vrednost (predprocesiranje). Na osnovu matrica sačinjenih od ulaznih podataka (48 uzoraka \times 431 talasna dužina) PCA modeli su izgrađeni i korišćeni u daljoj analizi. PCA je pojedinačno primenjena na 19 sinhronih spektara (za svaki sinhroni interval od 30 do 120 nm) u cilju: analize varijansi između lezija kože, utvrđivanja da li ispitivane grupe imaju različite spektralne karakteristike i definisanja sinhronog intervala u kome je postignuto najbolje razdvajanje između grupa. Ako bi se zadovoljavajuće razdvajanje između ispitivanih grupa kože postiglo definisanjem jednog spektra, bilo bi moguće relativno brzo (za nekoliko minuta) dijagnostikovati različite kožne promene, što je od velikog značaja za *in vivo* merenja. Za 19 izgrađenih PCA modela broj glavnih

komponenti je varirao u opsegu od 4 do 6, u skladu sa procentom kumulativne varijanse od 95%.



Slika 4.3. PCA grafik zavisnosti skorova sinhronih luminescentnih spektara za sinhroni interval $\Delta\lambda=70$ nm.

Na slici 4.3. je prikazan PCA grafik zavisnosti skorova za melanom, nevus i zdravu kožu dobijen analizom predprocesiranih sinhronih spektara za sinhroni interval $\Delta\lambda=70$ nm. Jasno se vide razdvojene sve tri grupe kože na osnovu njihovih spektralnih karakteristika. Važno je istaći da je razdvajanje između grupa postignuto korišćenjem samo dve glavne PCA komponente sa malim varijacijama između klasa, što zapravo znači da pomenute grupe imaju posebne karakteristike koje su jedinstvene za svaku od njih.

S obzirom da je izgrađeno 19 PCA modela za svaki sinhroni interval, vizuelno najbolje razdvajanje između grupa je postignuto za sinhroni interval $\Delta\lambda=70$ nm, što je

trebalo i statistički potvrditi. Iz tog razloga je primenjena linearna diskriminantna analiza (LDA).

Kako je redukcija dimenzionalnosti podataka postignuta primenom PCA analize, LDA je primenjena korišćenjem takvih podataka. Ova analiza je urađena da se definiše sinhroni interval u kome je postignuto najbolje razdvajanje između grupa. Dvadeset LDA modela (za 19 sinhronih intervala i 1 „raspakovani“ (unfolded) sadrži sve sinhrone intervale zajedno) je izgrađeno na osnovu prethodno izračunate 4 glavne PCA komponente. Dobijene vrednosti klasifikacionih grešaka za sve LDA modele prikazane su u tabeli 4.1. Može se primetiti da su najmanje vrednosti klasifikacionih grešaka od 2,1% dobijene za sinhrone intervale $\Delta\lambda=55-70$ nm i od $\Delta\lambda=90-105$ nm.

Tabela 4.1 Klasifikacione greške LDA modela dobijenih od SLS spektara za sve sinhrone intervale i „raspakovane“ intervale

$\Delta\lambda$ (nm)	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75
LDA greška	16.7%	22.9%	12.5%	10.4%	6.3%	2.1%	2.1%	2.1%	2.1%	4.2%
$\Delta\lambda$ (nm)	80	85	90	95	100	105	110	115	120	raspakovani
LDA greška	4.2%	4.2%	2.1%	2.1%	2.1%	2.1%	8.3%	10.4%	10.4%	4.2%

4.3 Klasifikacija lezija kože diskriminantnom analizom parcijalno najmanjih kvadrata

Da bi se potvrdili dobijeni rezultati PCA i LDA, diskriminantna analiza parcijalno najmanjih kvadrata (PLS-DA) je primenjena. PLS-DA je praktična metoda koja se koristi za pravljenje diskriminantnih modela. Prednost ove metode je njena primena za klasifikaciju višedimenzionih podataka.

Dvadeset PLS-DA klasifikacionih modela je izgrađeno korišćenjem izmerenih sinhronih luminescentnih spektara za svaku vrednost sinhronog intervala ($\Delta\lambda=30-120$ nm). PLS-DA modeli su napravljeni na osnovu PLS algoritma korišćenjem prethodno izračunatih PCA glavnih komponenti (odjeljak 4.2). Za svaki model urađena je validacija metodom preklapanja formiranjem tri različite kombinacije setova podataka. Svaki set podataka za validaciju se sastojao od seta podataka za obuku (32 uzoraka) i test seta (16 uzoraka) nepoznatih modelu. Broj komponenata u modelu se određuje na osnovu kalibracionih grešaka i grešaka unakrsne validacije dobijene korišćenjem modela za različiti broj latentnih varijabla. U ovom radu, broj latentnih varijabla se kretao u opsegu od 6 do 8. Posle izvršene validacije, za svaki klasifikacioni model dobijene su klasifikacione greške, krive operativnih karakteristika (ROC krive) i grafici graničnih vrednosti modela (threshold plot). U tabeli 4.2 su date dobijene vrednosti klasifikacionih grešaka za sve izgrađene PLS-DA modele.

Tabela 4.2 Klasifikacione greške PLS-DA modela za sve sinhronne intervale

$\Delta\lambda$ (nm)	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75
PLS-DA greška	19.1%	12.8%	12.4%	12.1%	12.9%	10.8%	4.0%	6.5%	1.1%	6.5%
$\Delta\lambda$ (nm)	80	85	90	95	100	105	110	115	120	raspakovani
PLS-DA greška	11.0%	10.3%	9.4%	8.9%	8.2%	9.6%	9.7%	10.7%	10.6%	3.7%

Dobijeni rezultati pokazuju da su se vrednosti PLS-DA grešaka kretale od 19.1% za sinhroni interval $\Delta\lambda=30$ nm do najmanje vrednosti od 1.1% za sinhroni interval $\Delta\lambda=70$ nm čime je potvrđeno da je najbolje razdvajanje između grupa postignuto upravo za ovaj sinhroni interval.

U tabeli 4.3 su prikazane dobijene vrednosti kalibracionih i kros-validacionih grešaka PLS-DA modela za sinhroni interval $\Delta\lambda=70$ nm. Ovaj model je imao najniže vrednosti klasifikacionih grešaka i stopu uspešnosti veću od 98% nakon validacije izvršene sa uzorcima nepoznatim modelu.

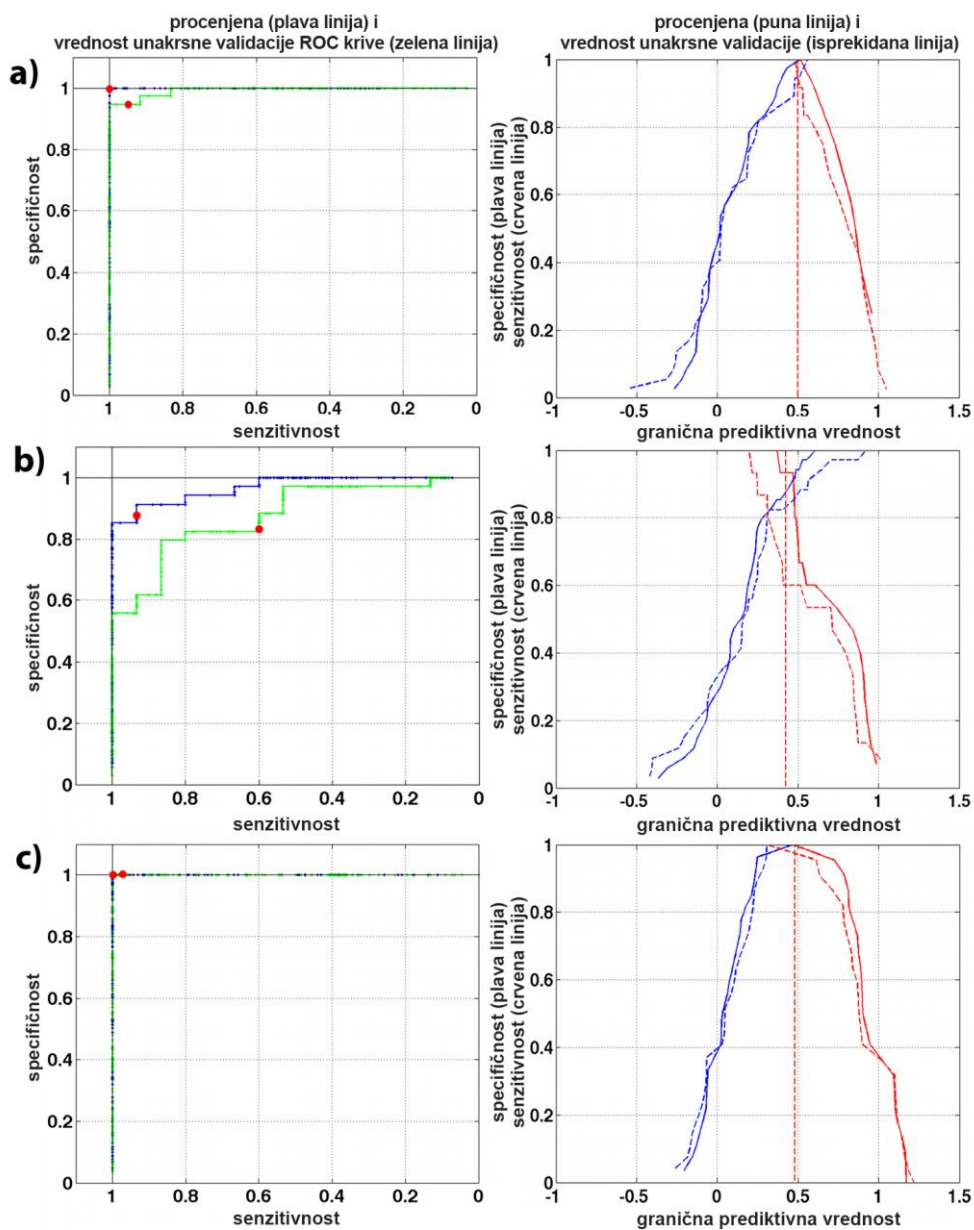
Tabela 4.3 Klasifikacione greške PLS-DA modela za sinhroni interval $\Delta\lambda=70$ nm

Klasifikacione greške [%]	Melanom	Nevus	Zdrava koža
Kalibracione greške	0	1.7	0
Greške unakrsne validacije	1.3	2.0	0

4.3.1 Evaluacija PLS-DA modela-kriva operativnih karakteristika (ROC)

Za testiranje krajnjeg modela pored niskih vrednosti klasifikacionih grešaka važno je da su procenjene vrednosti i vrednosti validacije modela približno iste. Kada su ovi kriterijumi ispunjeni, može se reći da dobijeni model optimalno opisuje ispitivani sistem.

U cilju testiranja izgrađenog klasifikacionog modela, pored grešaka klasifikacije, PLS-DA algoritam kao izlazne podatke daje krive operativnih karakteristika (ROC krive) i grafike graničnih vrednosti modela (threshold plot). ROC kriva grafički prikazuje učinak binarnog klasifikatora pri variranju vrednosti granice diskriminacije klase, i pokazuje koliko dobro PLS-DA model razdvaja jednu grupu uzoraka od ostalih. Senzitivnost i specifičnost modela izračunata je za svaku vrednost praga diskriminacije. Na slici 4.4 prikazane su krive operativnih karakteristika i grafici graničnih vrednosti izračunate za svaku grupu uzoraka u odnosu na druge dve, za klasifikacioni model lezija kože koji je izgrađen na osnovu izmerenih sinhronih spektara za sinhroni interval $\Delta\lambda=70$ nm. Ovaj petokomponentni PLS-DA model imao je stopu uspešnosti od 98,9% i dobre vrednosti operativnih karakteristika kao i graničnih vrednosti modela. Na graficima graničnih vrednosti može se uočiti da su procenjene vrednosti i vrednosti validacije modela za melanom (slika 4.4.a desno) i zdravu kožu (slika 4.4.c desno) skoro identične, na osnovu čega se može reći da je model stabilan. Takođe, može se uočiti da je manje variranje u pomenutim vrednostima prisutno u grupi nevusa (slika 4.4.b desno). Na graficima su vertikalnim linijama prikazane granične vrednosti koje pokazuju najbolju senzitivnost i specifičnost za sve tri grupe uzoraka kože (slika 4.4. levo, zelena i plava linija). Može se uočiti da su procenjene i validacione vrednosti ROC kriva (slika 4.4. levo, crvene tačke) skoro identične za melanom i zdravu kožu, dok su kod nevusa prisutna mala razdvajanja, čime se potvrđuju gore opisani rezultati na graficima graničnih vrednosti modela.



Slika 4.4 Krive operativnih karakteristika (levo) i grafici graničnih vrednosti (desno) PLS-DA modela za a) melanom, b) nevus i c) zdravu kožu u odnosu na druge dve grupe; plava linija predstavlja specifičnost; crvena linija predstavlja senzitivnost

U tabeli 4.4 su date izračunate vrednosti površina ispod kriva operativnih karakteristika za setove podataka za kalibraciju i setove podataka unakrsne validacije. Među njima je evidentno da je model kojim se diskriminiše zdrava koža od melanoma i nevusa najbolji (vrednosti površina ispod kriva operativnih karakteristika za setove podataka za kalibraciju i setove podataka unakrsne validacije iznose 1).

Tabela 4.4 Vrednosti površina ispod ROC krive za kalibracione i setove podataka unakrsne validacije jedne grupe uzoraka u odnosu na druge dve

Površina ispod ROC krive	Melanom	Nevus	Zdrava koža
Acal	1	0.97	1
Acv	0.99	0.93	1

Acal-kalibracija; Acv-unakrsna validacija; ROC- kriva operativnih karakteristika

4.4 Klasifikacija podataka veštačkim neuronskim mrežama

U okviru ove disertacije za klasifikaciju podataka korišćene su dve vrste veštačkih neuronskih mreža: samoorganizujuće mape (SOM) i višeslojni perceptron (MLP). SOM su jedne od najpopularnijih veštačkih neuronskih mreža koje pretvaraju višedimenzionalne nelinearne statističke veze u jednostavne geometrijske veze. MLP mreže se koriste za rešavanje širokog spektra problema gde se uz primenu algoritma s povratnom propagacijom greške vrši nadgledano učenje.

Prva faza u radu sa veštačkim neuronskim mrežama bila je obuka neurona. Da bi se to postiglo bilo je neophodno uneti ulazne podatke. Za obučavanje obe mreže kao podaci za obuku su korišćene izračunate PCA komponente (odjeljak 4.2). Da bi se procenile klasifikacione greške, mreže su testirane sa nepoznatim podacima.

4.4.1 Klasifikacija podataka dobijenih iz 3DSL spektara samoorganizujućom neuronskom mrežom

U okviru ove disertacije, izmereni su sinhroni spektri za 48 uzoraka melanoma, nevusa i zdrave kože. Prva faza u radu sa veštačkim neuronskim mrežama bila je obuka veštačkih neurona. Kao ulazni podaci za obuku samoorganizujuće neuronske mreže poslužile su 5 PCA glavnih komponenta za sinhroni interval $\Delta\lambda=70$ nm izračunate za 24 uzoraka (preostala polovina uzoraka poslužila je kao set podataka za testiranje mreže). Kako bi se povećao broj podataka za obuku mreže generisan je set podataka na osnovu srednje vrednosti i standardne devijacije pomenutih dobijenih PCA komponenta za 24 uzoraka. Dobijen je set od 2000 podataka koji su zatim korišćeni za obuku samoorganizujuće mreže.

Nakon obuke mreže svaki veštački neuron je formirao svoj set težinskih faktora (TF). Na ovaj način mreža je formirala svoju topologiju, tako da je nakon obuke sposobna da razvrstava podatke u skladu sa svojom topološkom funkcijom prepoznavajući u novim podacima svojstva koja je u prethodnom procesu “naučila”. U ovom slučaju mreža je obučena sa matricom podataka koja se sastojala od 2000 uzoraka i pet parametara koja opisuju svaki uzorak (2000×5). Mreža je obučavana sa 150

iteracija tokom čega je vršila klasifikaciju podataka u 3 polja koji predstavljaju 3 veštačka neurona u mreži. Tokom procesa obuke, mreža nije imala informacije o klasnoj pripadnosti uzoraka (nenadgledano učenje-znači mreža nije imala informaciju da li je uneti uzorak melanom, nevus ili zdrava koža) nego je klasifikovala podatke na osnovu svih ulaznih parametara. Nakon obuke, mreža je testirana sa 24 uzoraka nepoznata mreži i dobijene su klasifikacione greške. Proces obuke i testiranja mreže je ponavljan nekoliko puta koristeći različite kombinacije podataka za obuku i testiranje. Na taj način omogućen je mnogo precizniji pregled efikasnosti korišćene metode. Za različite kombinacije ulaznih podataka vrednosti klasifikacionih grešaka su se kretale u opsegu od 2 do 3%, čime je potvrđena uspešnost ove metode u klasifikaciji ispitivanih grupa kože.

Ova mreža je uspela u potpunosti da razdvoji podatke, odnosno da sa 98% uspešnosti diferencira uzorke melanoma, nevusa i zdrave kože na osnovu njihovih veoma izraženih spektralnih karakteristika.

4.4.2 Klasifikacija podataka dobijenih iz 3DSL spektara metodom višeslojnog perceptrona

Višeslojni perceptron (MLP) predstavlja vrstu veštačkih neuronskih mreža kod koje su neuroni organizovani u slojeve gde ne postoji veza između neurona u istom sloju, kao ni povratna veza sa prethodnim slojem. Prvi sloj neurona prikuplja ulazne podatke, informacija se zatim prenosi kroz skrivene slojeve do izlaznog sloja neurona. Skriveni slojevi značajno povećavaju kapacitet učenja ove mreže.

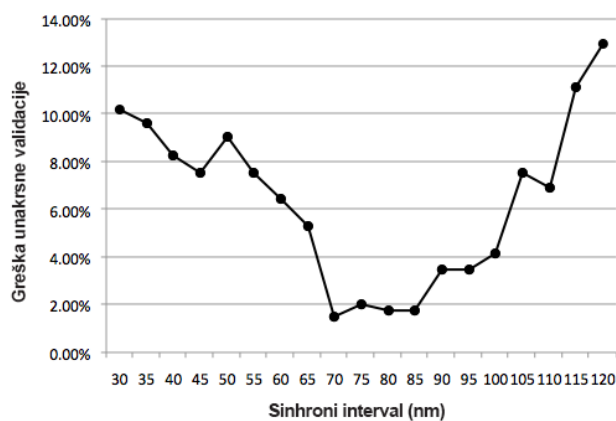
U ovoj disertaciji u cilju građenja klasifikacionog modela kao ulazni podaci za obuku mreže korišćene su iste matrice podataka kao za obuku samoorganizujuće mreže (2000 uzoraka i pet parametara koja opisuju svaki uzorak (2000×5)). Osnovna razlika u obuci ove dve mreže je što je pored pomenute matrice podataka, MLP obučavana i sa matricom podataka koja je sadržala informacije o klasnoj pripadnosti uzoraka (nadgledano učenje). Znači, tokom obuke mreža je u izlaznom sloju formirala tri klastera neurona sa podacima za ispitivane klase uzoraka (melanom, nevus i zdravu kožu). Mreža je imala 1 skriveni sloj. Najjednostavnije objašnjenje principa rada ove mreže bi bilo da su se podaci na ulazu grupisali prema poznatim parametrima podataka na izlazu mreže. Nakon obuke, mreža je testirana na isti način kao i samoorganizujuća mreža. Kao rezultat izgrađeno je nekoliko klasifikacionih modela koji su testirani različitim kombinacijama podataka i izračunata je srednja vrednost klasifikacionih grešaka svih modela koja se kretala u opsegu od 2 do 4%.

Na osnovu dobijenih rezultata pokazano je da je ova mreža vrlo uspešno razdvojila uzorke kože, što znači da ova metoda može imati primenu u dijagnostici različitih malignih stanja.

4.5 Klasifikacija podataka dobijenih iz 3DSL spektara metodom potpornih vektora

Metoda potpornih vektora (SVM) je statistički metod koji transformiše originalni prostor podataka u višedimenzioni prostor gde se vrši linearno klasifikovanje grupa.

U okviru ove analize bila su izgrađena trideset SVM klasifikacionih modela korišćenjem različitih ulaznih podataka. Prvo je bilo potrebno odrediti za koju vrednost sinhronog intervala ($\Delta\lambda$) se dobija najmanja greška klasifikacije. Iz tog razloga korišćeni su celi sinhroni spektri za sve sinhronne intervale kao podaci za obuku i testiranje klasifikacionih modela. Na slici 4.5. su prikazane dobijene srednje vrednosti klasifikacionih grešaka modela izražene u procentima za različite vrednosti sinhronih intervala ($\Delta\lambda=30-120$ nm). Može se primetiti da su najmanje vrednosti grešaka dobijene za sinhronne intervale u opsegu od 70 do 90 nm ($\Delta\lambda=70-90$ nm), dok je najniža klasifikaciona greška od 1,5% dobijena za sinhroni interval $\Delta\lambda=70$ nm.

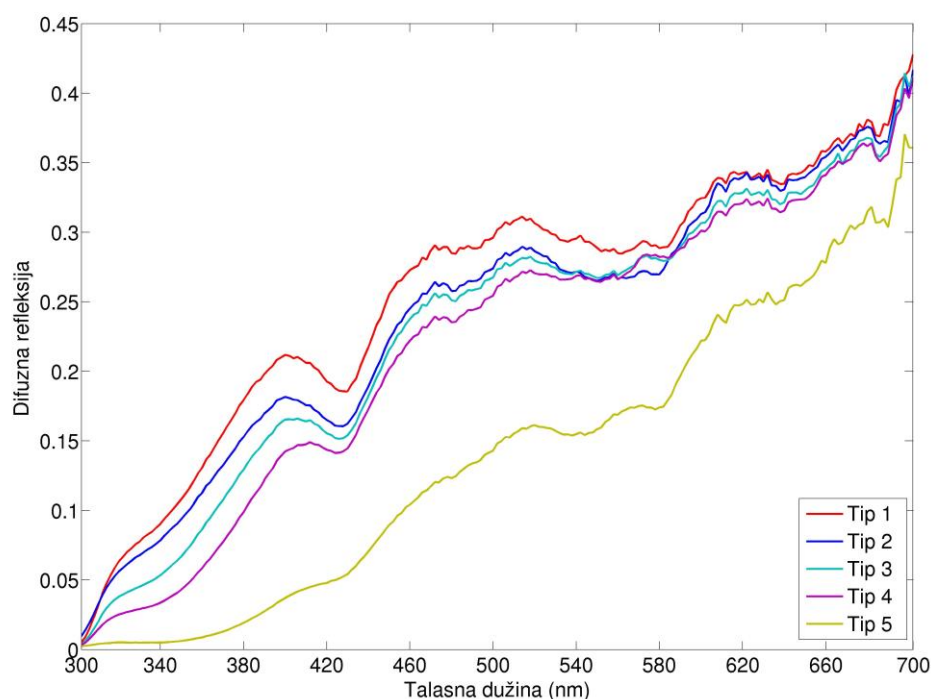


Slika 4.5. Greške SVM klasifikacije za sinhroni interval $\Delta\lambda=30-120$ nm

4.6 Difuzna refleksija kože

Drugi deo eksperimentalnih rezultata predstavljaju merenja difuzne refleksije kože volontera. Merenja su izvršena *in vivo* na dve regije kože volontera: čelu i šaci. Volonteri su klasifikovani po tipu kože (Ficpatrikov sistem klasifikacije fototipova kože; I-VI), starosnoj grupi (I do 30 godina; II od 30 do 60 godina i III od 60 godina) i polu (muškarci i žene).

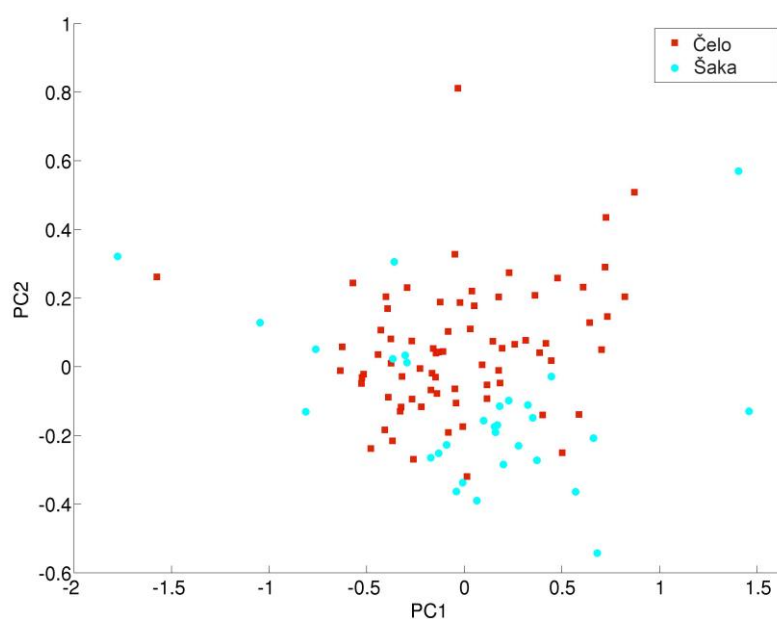
Na slici 4.6. su prikazani izmereni usrednjeni difuzno-refleksioni spektri čela volontera koji su klasifikovani po fototipu kože.



Slika 4.6. Usrednjeni difuzno-refleksioni spektri kože čela podeljeni po fototipu kože

Može se uočiti razdvajanje po fototipovima kože na osnovu snimljenih refleksionih spektara. Takođe, vidljiva su dva pika u spektralnim regionima od 350 nm do 425 nm i od 430 nm do 540 nm, za sve fototipove kože.

U sledećoj fazi rada dobijene difuzno-refleksione spektre čela i šake smo analizirali analizom glavnih komponentata (PCA) koja je detaljno objašnjena u odeljku 3.5.1. Dobijeni rezultati PCA su prikazani na slici 4.7.



Slika 4.7. PCA grafik zavisnosti skorova difuzno-refleksionih spektara kože čela i šake

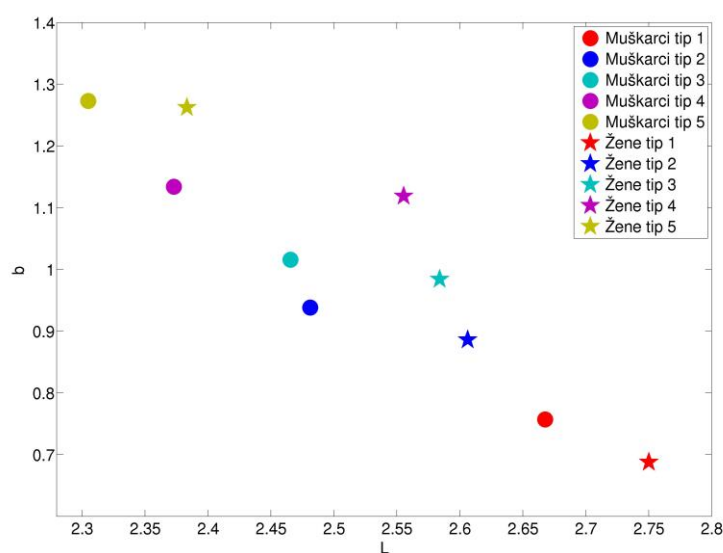
Na PCA grafiku je uočljivo grupisanje kože čela i šake na osnovu snimljenih refleksionih spektara. Takođe, na grafiku se mogu primetiti i mala preklapanja uzoraka između grupa.

4.7 Određivanje boje kože $L^*a^*b^*$ sistemom

$L^*a^*b^*$ sistem boja predstavlja najčešće korišćeni standardni sistem za definisanje boja u kome su boje raspoređene u trodimenzionalnom prostoru. Parametar L^* označava osvetljenost, parametar a^* označava nijanse boja od zelene do crvene dok b^* parametru odgovaraju nijanse boja od plave do žute.

Kao što je ranije rečeno, difuzno-refleksioni spektri su snimljeni na 2 regije kože volontera koji su podeljeni u tri grupe: po fototipu, starosti i polu. Dobijene spektralne vrednosti su transformisane u $L^*a^*b^*$ sistem za određivanje boja (odjeljak 3.7). U suštini to znači da pomoću refleksionih spektara možemo odrediti boju kože koristeći parametre $L^*a^*b^*$ sistema.

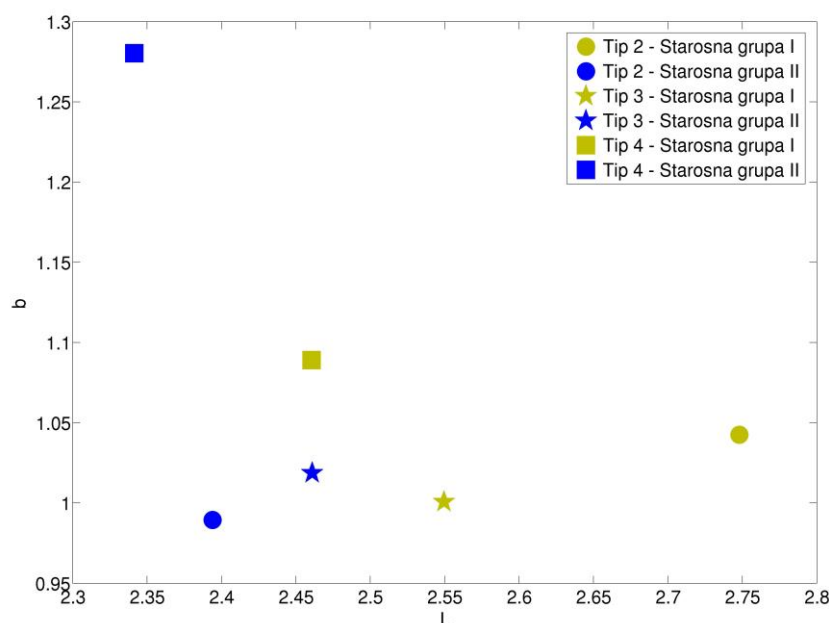
Na slici 4.8 su predstavljeni rezultati izračunatih L^* i b^* parametara iz refleksionih spektara koji su snimljeni na koži čela volontera (vrednosti a^* parametra nisu pokazale zavisnost sa posmatranim grupama). U ovom slučaju prikazane su vrednosti pomenutih parametara za dve kategorije kože volontera. Prva kategorija predstavlja fototip kože (Ficpatrikova klasifikacija) dok druga kategorija predstavlja podelu po polu (muškarci i žene).



Slika 4.8. Grafik zavisnosti L^* i b^* parametara boje od fototipa kože i pola volontera

Na osnovu prikazanih rezultata na slici 4.8. može se uočiti da su u okviru istog fototipa kože vrednosti L^* parametra niže kod muškaraca što zapravo znači da je boja kože muškaraca tamnije nijanse u odnosu na boju kože žena. Takođe se može uočiti da je vrednost b^* parametra viša kod muškaraca nego kod žena za isti fototip kože. Ako se posmatra samo fototip kože može se uočiti da sa porastom broja fototipa kože opada vrednost L^* parametra, odnosno koža je tamnija, dok vrednost b^* parametra raste tj. koža ima veću vrednost žute komponente.

Na slici 4.9 su prikazane izračunate vrednosti L^* i b^* parametara boje dobijenih iz refleksionih spektara koji su izmereni na koži čela volontera. U ovom slučaju analizirana je boja kože volontera za dve kategorije: starost i fototip kože.



Slika 4.9. Grafik zavisnosti L^* i b^* parametara boje od fototipa kože i starosti volontera

Na grafiku se može uočiti da su vrednosti L^* parametra niže kod starosne grupe II za isti fototip kože, što znači da je kod starije grupe volontera koža tamnije nijanse. Međutim vrednosti b^* parametra variraju kod različitih fototipova kože. Za fototip 3 i 4 vrednosti b^* parametra su više kod starije grupe volontera dok su za fototip 2 vrednosti pomenutog parametra više kod mlađe grupe volontera.

5. DISKUSIJA

Kao što je ranije rečeno (odeljak 3) eksperimentalni deo ovog rada sastojao se iz dva dela. Prvi deo su činila merenja sinhronih spektara pigmentnih kožnih lezija i zdrave kože korišćenjem dve spektroskopske tehnike (SLS i 3DSLS), dok su drugi deo činila merenja difuzne refleksije kože volontera. Stoga bi i diskusija rezultata bila u okviru analize svake tehnike sa posebnim akcentom na poređenju rezultata dveju pomenutih spektroskopskih tehnika.

Sinhrona luminescentna spektroskopija (SLS) je relativno nova luminescentna tehnika koja se koristi u ispitivanju luminescentnih svojstava različitih vrsta tkiva. Trodimenzionalna SLS je modifikovana tehnika kod koje se dobija serija sinhronih spektara za različite sinhronne intervale, što ovu metodu čini veoma korisnom u analizi višekomponentnih sistema kao što su tkiva. Stoga je izbor ovih tehnika za analizu fluorescentnih svojstava pigmentnih promena na koži i zdrave kože bio logičan.

Pravljenje usrednjenih sinhronih spektara bio je neophodan korak za uspostavljanje kriterijuma za brzu i pouzdanu diskriminaciju pomenutih lezija i zdrave kože. Na konturnim dijagramima trodimenzionalnih sinhronih luminescentnih spektara melanoma, nevusa i zdrave kože (slika 4.1.) lako se mogu uočiti značajne razlike u intenzitetu fluorescencije između pomenute tri grupe, koje su posledica promena u koncentraciji endogenih fluoroforma i hromofora kože, kao i izmenjenog lokalnog okruženja u kome se fluoroforme nalaze. Na pomenutim konturnim graficima uočavaju se tri regiona sa izrazito jasnim razlikama između melanoma, nevusa i zdrave kože.

U prvom spektralnom regionu u eksitacionom opsegu od 330 do 400 nm i sinhronom intervalu od 30 do 55 nm mogu se uočiti razlike u intenzitetu fluorescencije između ispitivanih grupa uzoraka. Literaturni podaci pokazuju da strukturni proteini vanćelijskog matriksa kože, kolagen i elastin imaju maksimume eksitacije u pomenutom regionu (Ramanujam, 2000). Za degradaciju kolagena odgovorna je metaloproteinaza – kolagenaza, koja ima važnu ulogu u remodeliranju tkiva. U literaturi je opisano da pri procesu transformacije tkiva iz zdravog u maligno dolazi do degradacije i/ili promena u unakrsnim vezama (“cross-links”) kolagena koje utiču na njegove fluorescentne osobine (Georgakoudi, 2002). To znači da je raskidanje unakrsnih veza u kolagenu posledica

povećane koncentracije kolagenaza u tumorskom tkivu. Kao posledica, dolazi do promene u koncentraciji kolagena u tumorskom tkivu. Znači, može se reći da uočene razlike u fluorescenciji zdrave kože, nevusa i melanoma potiču od promena u strukturi vanćelijskog matriksa kože.

Drugi (II) i treći (III) spektralni regioni se prostiru od 425 do 480 nm i od 340 do 400 nm eksitacionog opsega, i od 30 do 55 nm i od 65 do 105 nm sinhronog intervala, respektivno. U ovom slučaju evidentno je da normalna koža ima intenzivniji luminescentni odziv u odnosu na nevus i melanom, i uočava se znatna razlika u morfologiji konturnih 3DSL spektara. Na fluorescenciju ovih regiona utiče nekoliko fluorofora kao što su koenzimi NADH i FAD, i glavne apsorbujuće hromofore kože (melanin i hemoglobin). Kako nevus i melanom predstavljaju pigmentne kožne promene (imaju veću koncentraciju melanina nego zdrava koža) apsorpcija svetlosti koja potiče od hromofora znatno utiče na fluorescenciju prisutnih fluorofora, što rezultuje manjim luminescentnim odzivom pigmentnih kožnih promena u odnosu na zdravu kožu. Takođe, na fluorescenciju kože utiču i pomenute fluorofore NADH i FAD. Ovi koenzimi imaju značajnu ulogu u metaboličkim oksido-redukcionim reakcijama različitih tkiva. Naime, promene u metaboličkom statusu tkiva očekivano dovode do promena u koncentraciji odgovarajućih koenzima. Prilikom transformacije zdravog tkiva u maligno dolazi do promene metabolizma iz aerobnog u anaerobni, što je praćeno remećenjem mitohondrijalnog metabolizma, i kao rezultat ovih promena povećava se koncentracija prenosioca elektrona kao što su NADH i FAD. Literaturni podaci pokazuju da pri razvoju određenih tumora dolazi do povećanja koncentracije ovih koenzima (Uppal, 2003). Shodno tome bi se moglo očekivati da se u sinhronim spektrima melanoma javi maksimum emisije za ove koenzime. Međutim, dobijeni spektri pokazuju da je intenzitet emisije ovih koenzima najveći kod zdrave kože (slika 4.1c) što se može objasniti na nekoliko načina. Prvo, u fluorescentnim spektrima tkiva se javljaju široki maksimumi koji su rezultat pojedinačnog doprinosa svih prisutnih fluorofora, tako da je njihovo preklapanje neizbežno. U ovom slučaju, dolazi do preklapanja fluorescentnih spektara kolagena i NADPH/NADH. Kako se koncentracija umreženog kolagena u malignom tkivu smanjuje dok koncentracija koenzima raste, dati intenzitet fluorescencije u odgovarajućem regionu za maligno tkivo predstavlja rezultat razlike njihovih pojedinačnih doprinosa. Takođe, smanjenje intenziteta fluorescencije

pomenutih koenzima u uzorcima melanoma i nevusa bi se moglo objasniti vremenom koji uzorak provede od operacije do merenja fluorescencije. Naime, pokazano je da stajanjem tkiva dolazi do relativnog pada intenziteta fluorescencije NADH, kao i da starost pacijenta utiče na pomenutu koncentraciju (Uppal, 2003). Takođe, ovi podaci se uglavnom odnose na *in vivo* merenja fluorescencije. U našem slučaju, izvršena su *in vitro* merenja posle izvesnog vremenskog perioda od operacije i uzorci su uzeti uglavnom od starijih pacijenata.

Iako 3DSL spektri melanoma, nevusa i zdrave kože sadrže sve neophodne spektralne karakteristike za diskriminaciju pomenutih lezija, oni nisu pogodni za korišćenje u dijagnostičke svrhe. Primena ove tehnike u kliničkoj praksi je teško izvodljiva zbog dužine snimanja jednog takvog spektra koje traje u proseku oko sat vremena. Takođe, dodatno otežavajuća okolnost je što analiza svih dobijenih podataka traje određeno vreme. Međutim snimanje takvih spektara je korisno iz više razloga. Prvo, na taj način se dobija ukupan fluorescentni odgovor kože u širokom opsegu eksitacije i emisije, a drugo, dobija se mogućnost da se definišu spektralne karakteristike koje mogu poslužiti kao pouzdan parametar za diskriminaciju kožnih promena. Takođe, informacije koje pružaju 3DSL spektri omogućavaju da se istovremenim menjanjem eksitacije i emisije razdvoje spektri fluorofora. Iz ovih razloga, upotrebom klasične sinhronne luminescentne spektroskopije, tj. na osnovu obrađenih podataka dobijenih spektara, moguće je pronaći jedan sinhroni spektar koji pruža najviše podataka za diskriminaciju pomenutih tkiva. S obzirom da snimanje jednog takvog spektra traje samo jedan i po minut, klasična sinhrona spektroskopija je pogodna za brzu dijagnostiku.

Na osnovu analize dobijenih 3DSL podataka metodama multivarijantne analize izabran je sinhroni spektar sa sinhronim intervalom od $\Delta\lambda$ 70 nm (slika 4.2.). Drugim rečima to znači da je za interval eksitacije od 330 do 550 nm snimljen emisioni spektar od 400 do 620 nm. Tu činjenicu treba imati u vidu pri tumačenju sinhronih spektara. Na pomenutom spektru prikazanom na slici 4.2, jasno se može primetiti da se emisioni pikovi nalaze u dva spektralna regiona i to od 350 do 425 nm (spektralni region a) i od 425 do 550 nm (spektralni region b) eksitacionog opsega. Takođe se može uočiti da je intenzitet fluorescencije najviši za normalnu kožu a najniži za melanom. Razlike u intenzitetu fluorescencije između tkiva potiču od različite emisije glavnih fluorofora:

kolagena, elastina i koenzima NADH i FAD-a. Uticaj ovih fluorofora na intenzitet fluorescencije je prethodno objašnjen na rezultatima dobijenim iz 3DSL spektara.

Detekcija kožnih tumora korišćenjem optičke spektroskopije predstavlja izazov iz razloga što boja kože ima veliki uticaj na spektralne osobine kože. Varijacije u intenzitetu fluorescencije u ispitivanom spektralnom regionu od 330 nm do 550 nm potiču od tri glavne apsorbujuće hromofore kože: melanina, hemoglobina i bilirubina (Anderson, 1981). Doprinos melanina i hemoglobina varijacijama u intenzitetu fluorescencije kože ljudi je značajan, iz razloga što koncentracije ovih hromofora u koži dosta variraju kod različitih ljudi. Nasuprot njima, varijacije u koncentraciji bilirubina imaju zanemarljiv uticaj na intenzitet fluorescencije.

Prethodno opisane razlike u spektralnim luminescentnim karakteristikama sinhronih spektara pigmentnih lezija i zdrave kože vizuelno gledano, mogle bi biti dovoljne za uspostavljanje kriterijuma za njihovu optičku diferencijaciju. Međutim, na taj način se ne mogu dobiti pouzdani kriterijumi za dijagnostičku diskriminaciju melanoma, nevusa i zdrave kože. Zato su primenjene metode multivarijantne analize u cilju preciznog i objektivnog definisanja spektralnih karakteristika pomenutih tkiva.

Rezultati analize glavnih komponentata (PCA) i linearne diskriminantne analize (LDA) primenjene na izmerene spektre pokazuju da je najbolje razdvajanje između grupa kože postignuto za sinhroni interval $\Delta\lambda=70$ nm. Za ovu vrednost sinhronog intervala linearnom diskriminantnom analizom dobijena je greška klasifikacije od 2.1% (tabela 4.1) što predstavlja dobar rezultat. Da bi se potvrdili dobijeni rezultati PCA i LDA, diskriminantna analiza parcijalno najmanjih kvadrata (PLS-DA) je primenjena i takođe je na osnovu izračunatih vrednosti kalibracionih i kros-validacionih grešaka PLS-DA modela pokazano da je najbolja klasifikacija uzoraka kože postignuta za pomenuti sinhroni interval (tabela 4.2). U cilju testiranja izgrađenog klasifikacionog modela date su krive operativnih karakteristika (ROC krive) koje pokazuju koliko dobro PLS-DA model razdvaja jednu grupu uzoraka od ostalih (slika 4.4). Na graficima graničnih vrednosti pokazano je da su procenjene vrednosti i vrednosti validacije modela za melanom i zdravu kožu skoro identične, na osnovu čega se može reći da je model stabilan. Manje variranje u pomenutim vrednostima prisutno je u grupi nevusa iz razloga što u njoj postoji veća varijabilnost među uzorcima nego kod zdrave kože i melanoma. Ipak, može se reći da je klasa nevusa dobro opisana modelom.

U okviru ove disertacije, izmereni sinhroni spektri korišćeni su za obuku dve vrste veštačkih neuronskih mreža: SOM i MLP. Razlika između ove dve mreže je što tokom procesa obuke SOM vrši nenadgledano učenje dok MLP ima nadgledano učenje. Kao ulazni podaci za obe mreže korišćene su 5 PCA glavnih komponenta za sinhroni interval $\Delta\lambda=70$ nm izračunate za 24 uzorka dok je preostala polovina uzoraka poslužila kao set podataka za testiranje mreže (odjeljak 4.4.1).

SOM i MLP su uspele u potpunosti da razdvoje podatke, odnosno da sa 98% i 96% uspešnosti diferenciraju uzorke melanoma, nevusa i zdrave kože na osnovu njihovih veoma izraženih spektralnih karakteristika. Ovaj rezultat ima dodatni značaj ako se uzme u obzir da su ove metode brze, osetljive i autonomne u klasifikaciji podataka i kao takve veoma pogodne za implementaciju u moguće dijagnostičke sisteme. U suštini, osnovna ideja za primenu veštačkih neuronskih mreža na ove podatke je bila da se pokaže da je u perspektivi izborom odgovarajuće veštačke neuronske mreže moguće isključiti ljudski faktor u konačnom odlučivanju o vrsti analiziranog tkiva. Traganje za optimalnom mrežom može biti jedan od važnih koraka u definisanju dijagnostičkog sistema zasnovanog na luminescenciji tkiva.

Poslednja metoda koja je primenjena u analizi sinhronih spektara je metoda potpornih vektora (SVM). Na osnovu dobijenih srednjih vrednosti klasifikacionih grešaka modela izraženih u procentima za različite vrednosti sinhronih intervala ($\Delta\lambda=30-120$ nm) pokazano je da je najniža klasifikaciona greška od 1,5% dobijena za sinhroni interval $\Delta\lambda=70$ nm (slika 4.5.). S obzirom na dobijene rezultate, ovde je pokazano da je moguće izgraditi dobar model za klasifikaciju uzoraka melanoma, nevusa i zdrave kože metodom potpornih vektora na osnovu spektralnih karakteristika pomenutih grupa kože. Stoga, može se reći da u perspektivi ova metoda može biti veoma korisna u cilju poboljšanja dijagnostike kancera kože.

Drugi deo eksperimentalnog rada u ovoj disertaciji činila su merenja difuzne refleksije kože ljudi na dve regije tela. Na osnovu izmerenih difuzno-refleksionih spektara čela volontera pokazano je razdvajanje po fototipovima kože (slika 4.6.). Razlike u refleksionim spektrima potiču od različitih hromofora prisutnih u koži. Melanin i hemoglobin su glavne hromofore kože koje apsorbuju u vidljivom delu spektra (Zonious, 2001). Hemoglobin se nalazi u dermisu kože u opsegu od 50 do 500 μm od površine kože, dok je melanin lokalizovan u epidermisu u opsegu dubine kože od

50 do 100 μm . Koncentracija melanina dosta varira kod različitih fototipova kože, najmanja je kod fototipa I dok je najviša kod fototipa VI (Young, 1997). Pomenuti trend uočljiv je na dobijenim refleksionim spektrima kože (slika 4.6.). Ovde je važno naglasiti da je Ficpatrikov sistem klasifikacije fototipova kože subjektivna metoda, što dobijene rezultate refleksionih merenja čini veoma značajnim u smislu njihove objektivnosti. Možemo pretpostaviti da bi se još bolji rezultati razdvajanja po fototipovima kože na osnovu refleksionih spektara dobili na još većem broju uzoraka.

Difuzno-refleksioni spektri čela i šake su analizirani analizom glavnih komponenata (PCA). Pokazano je uočljivo grupisanje kože čela i šake na osnovu snimljenih refleksionih spektara (slika 4.7.). Ovaj rezultat je i očekivan jer se fiziologija kože čela i šake razlikuje što je i potvrđeno na osnovu spektralnih karakteristika pomenutih regija kože. Takođe, na grafiku se mogu primetiti određena preklapanja uzoraka između grupa što može biti iz više razloga. Prvo, snimljena su 74 refleksiona spektra kože čela i 31 spektar kože šake što je relativno mali broj podataka za ovakvu vrstu analize. Takođe, spektralne karakteristike određenih komponenata kože su slične za obe regije, pa je i očekivano da dolazi do preklapanja istih.

U sledećoj fazi rada dobijene spektralne vrednosti su transformisane u $L^*a^*b^*$ sistem za određivanje boja. U suštini to znači da pomoću refleksionih spektara možemo odrediti boju kože koristeći parametre $L^*a^*b^*$ sistema. Na grafiku na slici 4.8 može se uočiti da u okviru istog fototipa kože postoji razlika u boji kože između muškaraca i žena. Naime, jasno se vidi da su u okviru istog fototipa kože vrednosti L^* parametra niže kod muškaraca što zapravo znači da je boja kože muškaraca tamnije nijanse u odnosu na boju kože žena. Takođe se može uočiti da je vrednost b^* parametra viša kod muškaraca nego kod žena za isti fototip kože. Pošto b^* parametar u ovom slučaju predstavlja nijanse žute boje, može se reći da koža muškaraca ima jače nijanse žute boje u odnosu na boju kože žena u okviru istog fototipa kože. Ako se posmatra samo fototip kože može se uočiti da sa porastom broja fototipa kože opada vrednost L^* parametra, odnosno koža je tamnija, dok vrednost b^* parametra raste tj. koža ima veću vrednost žute komponente.

Rezultati dobijeni analizom boje kože volontera za dve kategorije, starost i fototip kože su takođe interesantni. Naime, na grafiku na slici 4.9 pokazano je da su vrednosti L^* parametra niže kod starosne grupe II za isti fototip kože, što znači da je

kod starije grupe volontera koža tamnije nijanse. Međutim, vrednosti b^* parametra variraju kod različitih fototipova kože. Za fototip 3 i 4 vrednosti b^* parametra su više kod starije grupe volontera dok su vrednosti pomenutog parametra više kod mlađe grupe volontera za fototip 2. Naravno pri interpretaciji ovih rezultata treba imati u vidu da je Ficpatrikov sistem klasifikacije subjektivna metoda i da je u našem slučaju izmeren relativno mali broj difuznih spektara kože. Ipak, dobijeni rezultati predstavljaju dobru osnovu za objektivno određivanje boje kože na osnovu difuzne refleksije.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu opsežne analize dobijenih rezultata u ovoj doktorskoj disertaciji mogu se izvesti sledeći zaključci:

Koža je sastavljena od različitih molekula koji fluoresciraju u ultraljubičastom i vidljivom delu elektromagnetnog spektra. Razlike u fluorescenciji između pigmentnih kožnih lezija i normalne kože potiču od različite raspodele i koncentracije svih prisutnih fluorofora i hromofora kao i biohemijskih i biofizičkih promena u njihovoj neposrednoj okolini.

Razlika u spektralnim karakteristikama melanoma, nevusa i zdrave kože uočena je u rezultatima dobijenim primenom dve tehnike: SLS i 3DSLS. Pokazano je da je upotrebom klasične sinhronne luminescentne spektroskopije, odnosno iz jednog sinhronog luminescentnog spektra, moguće izvršiti brzu i pouzdanu diskriminaciju tkiva kože.

Na osnovu rezultata multivarijantne analize koja je primenjena na izmerene SLS spektre bilo je moguće izabrati jedan sinhroni interval ($\Delta\lambda=70$ nm) koji pruža najviše podataka za diskriminaciju melanoma, nevusa i zdrave kože i na osnovu kojeg je bilo moguće izgraditi optimalne PLS-DA modele. Evaluacijom kvaliteta dobijenih modela na osnovu vrednosti površina ispod kriva operativnih karakteristika, pokazano je da oni sa visokom stopom uspešnosti od 98% vrše diskriminaciju melanoma, nevusa i zdrave kože.

Trodimenzionalna SLS daje mogućnost za sveobuhvatnu spektralnu karakterizaciju kako kože tako i pigmentnih promena na koži. Međutim, ova merenja kao i analiza traju dugo pa nisu pogodna za brzi skrining. Nasuprot tome, klasična sinhrona luminescentna spektroskopija može imati veliku primenu u *in vivo* merenjima prvenstveno zbog brzine merenja.

Veštačke neuronske mreže obučene na generisanim podacima su u mogućnosti da klasifikuju podatke zdrave kože, nevusa i melanoma. Obučene SOM i MLP mreže primenjene na podatke dobijene iz SLS spektara, bile su u mogućnosti da besprekorno

klasifikuju podatke, odnosno sa 98% i 96% uspešnosti diferenciraju uzorke melanoma, nevusa i zdrave kože.

Pokazano je da je moguće izgraditi dobar model za klasifikaciju uzoraka melanoma, nevusa i zdrave kože metodom potpornih vektora na osnovu spektralnih karakteristika pomenutih grupa kože. Iz tog razloga, u perspektivi, ova metoda može biti veoma korisna u cilju poboljšanja dijagnostike kancera kože.

Imajući u vidu da je koža površinski organ koji je lako pristupačan za ovaj tip istraživanja, može se zaključiti da sinhrona luminescentna spektroskopija u kombinaciji sa multivarijantnom analizom može imati uspešnu primenu u dijagnostici kancera kože u budućnosti.

U ovoj disertaciji, na osnovu analize difuzno-refleksionih spektara zdrave kože, pokazano je da se objektivno može odrediti boja kože. Definisanjem parametara $L^*a^*b^*$ sistema boja dobijenih transformacijom iz refleksionih spektara kože, pokazano je da postoji korelacija između karakteristika kože i difuzno-refleksionih spektara.

7. LITERATURA

Abbasi N., Shaw H., Rigel D., Friedman R., McCarthy W., Osman I., et al., (2004) Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *J. Am. Med. Assocs.* 292(22): 2771-6.

Alfano R., Pu Y., (2013) Optical biopsy for cancer detection. *Lasers for Medical Application.* 11: 325-367.

Anderson R.R. and Parrish J.A., (1981) The optics of human skin. *J. Invest. Derm.* 77:13.

Askari M., Miller T., Vo-Dinh., (2001) Synchronous luminescence: a simple technique for the analysis of hydrolysis activity of the fragile histidine triad protein. *Biotech. Letters.* 23:1697-1702.

Balch C.M., Buzaid A.C., Soong S.J., Atkins M.B., Cascinelli N., Coit D.G., et al., (2001) Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J. Clin. Oncol.* 19: 3635-48.

Banerjee B., Miedema B., Chandrasekhar H.R., (1998) Emission spectra of colonic tissue and endogenous fluorophores. *Am. J. Med. Sci.* 316: 220-226.

Bissonnette R., Zeng H., McLean D.I., Schreiber W.E., Roscoe D.L., Lui H., (1998) Psoriatic plaques exhibit red autofluorescence that is due to protoporphyrin IX. *J. Invest. Dermatol.* 111(4): 586–591.

Brancaleon L., Durkin A.J., Tu J.H., Menaker G., Fallon J.D., Kollias N., (2001) In vivo Fluorescence Spectroscopy of Non-melanoma Skin Cancer. *Photochem. Photobiol.* 73(2): 178-183.

Braud F., Khayat D., Kroon Bin B. R., Valdagni R., Bruzzi P., and Cascinelli N., (2003) Malignant melanoma. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* 47: 35-63.

Burges C.J.C., (1998) A tutorial on support vector machines for pattern recognition. *Data Min. Knowl. Disc.* 2: 121-167.

- Byrne A. and Hilbert D.R., (1997) Introduction, Glossary, Reading on Color, vol 2, The MIT Press, Cambridge, MA. pp. 443-453.
- Clark W.H.J., From L., Bernardino E.A., Mihm M.C., (1969) The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 29: 705-727.
- Dawson J.B., Barker D.J., Ellis D.J., et al., (1980) A theoretical and experimental study of light absorption and scattering by in vivo skin. *Phys. Med. Biol.* 25: 6969.
- Dhawan A., (1992) Apparatus and method for skin lesion examination.
- Dinish U.S., Gulati P., Murukeshan V.M., Seah L.K., (2007) Diagnosis of colon cancer using frequency domain fluorescence imaging technique. *Optics Communications.* 271: 291-301.
- Dramićanin T. (2006a) Komparativna analiza optičkih svojstava zdravog i malignog tkiva luminescentnim spektroskopskim tehnikama. Doktorska disertacija
- Dramićanin T., Dimitrijević B., Dramićanin M.D., (2011) Application of Supervised Self-Organizing Maps in Breast Cancer Diagnosis by Total Synchronous Fluorescence Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 65(3): 293-297.
- Dramićanin T., Dramićanin M.D., Dimitrijević B., Jokanović V., Lukić V., (2006) Discrimination between normal and malignant breast tissues by Synchronous luminescence spectroscopy. *Acta Chim. Slov.* 53: 444-449.
- Dramićanin T., Dramićanin M.D., Jokanović V., Nikolić-Vukosavljević D., Dimitrijević B., (2005) Three-dimensional Total Synchronous Luminescence Spectroscopy Criteria for Discrimination between Normal and Malignant Breast Tissues. *Photochem. Photobiol.* 81(6): 1554-1558.
- Dramićanin T., Zeković I., Dimitrijević B., Ribar S., Dramićanin M.D., (2009) Optical Biopsy Method for Breast Cancer Diagnosis Based on Artificial Neural Network Classification of Fluorescence Landscape Data". *Acta Physica Polonica A.* 116(4): 690-692.

- Dubayova K., Kušnir L., Podracka L., (2003) Diagnostic monitoring of urine by means of synchronous fluorescence spectrum. *J. Biochem. Methods*. 55: 11-119.
- Ebenazar J., Aruna P., Ganesan S., (2010) Synchronous Fluorescence Spectroscopy for the Detection and Characterization of Cervical Cancers In Vitro. *Photochem. Photobiol.* 86: 77–86.
- Ficher G., Wang Z., et al., (1997) Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *New Engl. J. Med.* 337: 1419-28.
- Fitzpatrick T.B., (1988) The validity and practicality of sun-reaction skin types I through VI. *Arch. Dermatol.* 124: 869-71.
- Freeberg J.A., Benedet J.L., MacAulay C., West L.A., Follen M., (2007) The performance of fluorescence and reflectance spectroscopy for the *in vivo* diagnosis of cervical neoplasia; point probe versus multispectral approaches. *Gynecologic Oncology*. 107: S248-S-255.
- Friedman R., Rigel D., Kopf A., (1985) Early detection of malignant melanoma: the roll of physician examination and self examination of the skin. *CA: Cancer J. Clinicians*. 35(3): 130-51.
- Fukunaga K., (1990) Intoduction to Statistical Pattern recognition, Academic Press, San Diego, California
- Georgakoudi I., Jacobson B.C., Muller M.G., Sheets E.E., et al., (2002) NAD(P)H and Collagen as in Vivo Quantitative Fluorescent Biomarkers of Epithelian Precancerous Changes. *Cancer Res* . 62: 682-687.
- Gupta A., Discoll M.S., (2010) Do hormones influence melanoma? Facts and controversies. *Clin. Dermatol.* 28: 287-292.
- Heintzelman D.L., Utzinger U., Fuchs H., Zuluaga A., Gossage K., Gillenwater A.M., Jacob R., Kemp B., Richards-Kortum R., (2000) Optimal Excitation Wavelengths for In Vivo Detection of Oral Neoplasia Using Fluorescence Spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* 72(1): 103-113.

- Johnson T. M., Dolan O.M., Hamilton T.A., et al., (1998) Clinical and histologic trends of melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 38: 681-686.
- Kennedy J.C., Marcus S.L., Pottier R.H., (1996) Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitisation induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): mechanisms and clinical results". *J. Clin. Laser Med.Surg.* 14: 289–304.
- Kligman L., Kligman A., (1986) The nature and photoageing: its prevention and repair. *Photodermatol.* 3: 215-27.
- Kohonen T., (2001) Self-Organizing Maps., Springer, Berlin, Germany.
- Kolias N., Baqer N.A., (1986) *Photochem. Photobiol.* 43: 49.
- Kolias N., Zonios G., Stamatias N., (2002) Fluorescence spectroscopy of skin. *Vib. Spectrosc.* 28: 17-23.
- Kondepati V.R., Heise H.M., Backhaus J., (2008) Recent applications of near-infrared spectroscopy in cancer diagnosis and therapy. *Anal. Bioanal. Chem.* 390: 125-139.
- Lakowicz J.R., (1985) Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, New York
- Leffell D.J., Stetz M.L., (1988) *In vivo* fluorescence of human skin: a potential marker of photoaging. *Arch. Dermatol.* 124: 1514–1518.
- Lin W.C., Toms S.A., Jonson M., Jansen E.D. and Mahadaven-Jansen A., (2001) In Vivo brain tumor demarcation using Optical spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* 73: 396.
- Lloyd J.B.F., (1971) *Nature* 231: 64.
- Lohmann W. and Paul E., (1988) *In situ* detection of melanomas by fluorescence measurements. *Naturwissenschaften.* 75: 201–2.
- Lohmann W. and Paul E., (1989) Native fluorescence of unstained cryo-section of the skin and melanomas and nevi. *Naturwissenschaften.* 76: 424–6.

- Lucassen G.W., Hendriks N.H.W., Wesseling J., Ruers T.J.M., (2013) Improved identification of peripheral lung tumors by using diffuse reflectance and fluorescence spectroscopy. *Lung Cancer*. 80: 165-171.
- Lukas R. and Platonietos K.N., (2007) Color Image Proceessing: Methods and Aplication., CRC Press, Boca Raton, FL., pp 7-11.
- MacAdam D.L., (1997) The physical basis of color specification in: Byrne A. and Hilbert D.R., Reading on Color, vol 2, The MIT Press, Cambridge., pp. 33-64.
- Mackie R., Doherty V., (1991) Seven-point checklist for melanoma. *Clin. Exp. Dermatol.* 16(2): 151-152.
- Majumder S.K., Gupta P.K., (2000) Synchronous luminescence spectroscopy for oral cancer diagnosis. *Lasers Life Sci.* 9: 143-152.
- Masters B.R., Chance B., (1993) In: Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity. Academic Press, London
- Matsumura Y., Ananthaswamy H., (2004) Toxic effects of ultraviolet radiation on skin. *Toxicol. Appl. Pharm. Rev.* 195: 298-308.
- McGrath J.A, Uitto J., (2010) Anatomy and organization of human skin. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, editors. Rook's textbook of dermatology. Oxford: Wiley-Blackwell, pp. 1–53 [chapter 3].
- Nakanishi K., Ohsaki Y., Kurihara M., Nakao S., Fujita Y., et al., (2007) Color auto-fluorescence from cancer lesions: Improved detection of central type lung cancer. *Lung cancer*. 58: 214-219.
- Newton Bishop J. (2010) Lentigos, melanocytic nevi and melanoma. In: Burns T, Breathnach S, Cox N editors. Rooks textbook of dermatology. Oxford, Wiley-Blackwell, chaper 54, pp 1-57.
- Odetti P.R., Borgoglio A., Rolandi R., (1992) Age-related increase of collagen fluorescence in human subcutaneous tissue. *Metabolism* 41: 655-658.

- Pack G.T., Scharnagel I.M., (1951) The prognosis for malignant melanoma in the pregnant women. *Cancer* 4: 324-334.
- Palmer G.M., Ramanijam N., (2003) Diagnosis of Breast Cancer Using Optical Spectroscopy. *Medical Laser Application*. 18: 232-248.
- Patra D., Mishra A.K., (2002) Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis. *Trends. Anal. Chem.* 21: 787-798.
- Profio A.E., Doiron D.R., (1977) A Feasibility Study of the Use of Fluorescence Bronchopy for the Localization of Small Lung Tumors. *Phys. Med. Biol.* 22: 949-957.
- Queille-Roussel C., Poncet M. And Schaefer H., (1991) Quantification of skin colour changes induced by topical corticosteroid preparations using Minolta Chromameter. *Br. J. Dermatol.* 124: 364-270.
- Ramanujam N., (2000) Fluorescence spectroscopy in vivo". In: Encyclopedia of Analytical Chemistry. Chichester, New York: John Willey and Sons, pp. 20-56.
- Ramanujam N., (2000a) Fluorescence spectroscopy of Neoplasia and Non-Neoplastic Tissues. *Neoplasia*. 2: 89-117.
- Reed R.J., (1985) The histological variance of malignant melanoma: the interrelationship of histological subtype, neoplastic progression, and biological behavior. *Pathology* 17: 300-312.
- Sell D.R., Grandhee S.K., et al., (1991) Pentosidine: a molecular marker for the cumulative damage to protein diabetes, aging and uremia. *Diabetes Metab Rev.* 7: 239-251.
- Sidorff A., Thaler P., (2010) Taking treatment decisions in non-melanoma skin cancer—The place for topical photodynamic therapy (PDT). *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 7: 24-32.
- Singh A.D., Borden E.C. (2005) Metastatic uveal melanoma. *Ophthalmol. Clin. North. Am.* 18: 143-50.

- Snell R.S., Bischitz P.G., (1960) The effect of large doses of estrogen and progesterone on melanin pigmentation. *J. Invest. Dermatol.* 35: 73-82.
- Sterenborg H.J.C.M., (1994) *In vivo* fluorescence spectroscopy and imaging of human skin tumors“. *Lasers Med. Sci.* 9(3): 191–201.
- Stokes G.G., (1852) Über Die Anderung der Brechbarkeit des Lichtes. *Philos. Trans. R. Soc.* 107: 11.
- Stubel H., (1911) Die Fluoreszenz Tierischer Gewebe in Ultravioletten Licht. *Pflugers Arch. Physiol.* 142: 1.
- Svozil D., Kvasnicka V., Pospical J., (1997) Introduction to multi-layer feed-forward neural networks. *Chemometr. Intell. Lab.* 39: 43-62.
- Thakur A., Mishra V., Jain S.K., (2011) Feed Forward Artificial Neural Network: Tool for Early Detection of Ovarian Cancer. *Sci. Pharm.* 79: 493-505.
- Tyrell J., Campbell S., Curnow A., (2010) Protoporphyrin IX photobleaching during the light irradiation phase of standard dermatological methyl-aminolevulinate photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 7: 232-238.
- Ullrich S.E., (2005) Mechanisms underlying UV-induced immune suppression. *Mutat. Res. Rev.* 571: 185-205.
- Uppal A., Gupta P.K., (2003) Measurement of NADH Concentration in Normal and Malignant Human Tissues from Breast and Oral Cavity. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37: 45-50.
- Varmuza K., Filzmoser P., (2009) Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics., Boca Raton, FL: CRC Press., pp. 59-101.
- Vo-Dinh T., (1982) Synchronous luminescence spectroscopy: methodology and applicability *Appl. Spectrosc.* 36: 576-581.
- Vo-Dinh T., (2000) Principle of synchronous luminescence (SL) technique for biomedical diagnostics. *Proc. SPIE International Society for Optical Engineering.* 3911: 42-49.

- Whited J.D., Hall R.P., Simel D.L., Horner R.D., (1997) Primary care clinicians' performance for detecting actinic keratoses and skin cancer. *Arch Intern Med.* 157: 985-90.
- Wick M.M., Sober A.J., Fitzpatrick T.B., Mihm M.C., Kopf A.W., Clark W.H., et al.. (1980) Clinical characteristics of early cutaneous melanoma. *Cancer* 45:2684-6.
- Winton G.B., Lewis C.W., (1982) Dermatoses of pregnancy. *J. Am. Acad. Dermatol.* 6: 977-998.
- Yang Y., Ye Y., et al., (1987) Characteristic Autofluorescence for Cancer Diagnosis and its Origin. *Laser. Surg. Med.* 7: 528-532.
- Young A.R. (1997) Chromophores in human skin. *Phys. Med. Biol.* 42: 789-802.
- Yuvaraj M., Udayakumar K., Jayanth V., et al., (2014) Fluorescence spectroscopic characterization of salivary metabolites of oral cancer patients. *J. Photochem. Photobiol. B.* 130: 153-160.
- Zonious G., Bykowski J and Kollias N. (2001) Skin Melanin, Hemoglobin and Light Scattering Properties can be Quantitatively Assessed In Vivo Using Diffuse Reflectance Spectroscopy. *J. Invest. Dermatol.* 117: 1452-1457.
- Zupan J., Gasteiger J., (1999) Neural Networks in Chemistry and Drug Design. Wiley-VCH, Weinheim, Germany

8. BIOGRAFIJA

Ivana Zeković je rođena 16.09.1977. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Školske 1996/97. godine upisala je studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Izradu eksperimentalnog dela diplomskog rada počinje 2005. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na katedri za uporednu fiziologiju i endokrinologiju pod rukovodstvom prof. dr Cvijić Gordane. Diplomirala je aprila meseca 2006. godine odbranivši diplomski rad pod nazivom "Uticaj deksametazona i kortikosterona na koncentraciju vitamina C u različitim tkivima pacova tretiranih terpentinom", kod prof. dr Siniše Đuraševića. Školske godine 2006/07. upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na studijskom programu – Animalna i humana fiziologija, modul biomedicinska fiziologija. U oktobru mesecu 2006. godine zaposlila se u Institutu za nuklearne nauke "Vinča", u Laboratoriji za radijacionu hemiju i fiziku. Od tada osnovni predmet istraživanja Ivane Zeković je primena optičkih spektroskopskih metoda u biologiji i medicini.

Kandidat je koautor 11 naučnih radova u međunarodnim časopisima sa SCI liste. Objavila je značajan broj saopštenja iznetih na domaćim i međunarodnim konferencijama štampanim u celini i izvodu. Radovi iz teze su pod brojevima 1 i 5.

Spisak naučnih radova:

1. **I. Zeković**, L. Lenhardt, T. Damićanin, J. Bandić, M.D. Damićanin, "Discrimination among melanoma, nevi and normal skin by using synchronous luminescence spectroscopy" *Applied Spectroscopy*, (2014) 68(8), DOI: 10.1366/13-07 153
2. L. Lenhardt, **I. Zeković**, T. Damićanin, M.D. Damićanin, R. Bro, Determination of the Botanical Origin of Honey by Front-Face Synchronous Fluorescence Spectroscopy, *Applied Spectroscopy*, (2014) 68, 557-563

3. S. Samardžija-Jovanović, V. Jovanović, G. Marković, **I. Zeković**, M. Marinović-Cincović, Properties of Vulcanized Polyisoprene Rubber Composites Filled with Opalized White Tuff and Precipitated Silica, *The Scientific World Journal*, (2014) DOI: 10.1155/2014/913197
4. M. Vranješ, J. Kuljanin-Jakovljević, P.S. Ahrenkiel, **I. Zeković**, M. Mitrić. Z. Šaponjić, J. Nedeljković, Sm³⁺ doped TiO₂ nanoparticles synthesized from nanotubular precursors-luminescent and structural properties, *Journal of luminescence*, (2013) 143, 453-458
5. L. Lenhardt, **I. Zeković**, T. Damićanin, M.D. Damićanin, Artificial neural network for processing fluorescence spectroscopy data in skin cancer diagnostics. *Phys Scripta*, (2013) T 157 014057(4pp)
6. T. Damićanin, L. Lenhardt, **I. Zeković**, M.D. Damićanin, Support Vector Machine on Fluorescence Landscapes for Breast Cancer Diagnostics. *J Fluoresc.*, (2012) 22, 1281-1289
7. **I. Zeković**, L. Lenhardt, T. Damićanin, M.D. Damićanin, Classification of Intact Cereal Flours by Front-Face Synchronous Fluorescence Spectroscopy. *Food Anal. Methods*, (2012) 5, 1205-1213
8. R. Krsmanović, Ž. Antić, **I. Zeković**, B. Bártoová, M.D. Damićanin “(Y_{0.5}Lu_{0.5})₂O₃:Eu³⁺ nanopowders: combustion synthesis, structure and optical properties” *Radiation Measurements* (2010) 45, 438-440
9. R. Krsmanović, Ž. Antić, **I. Zeković**, M.D. Damićanin, Polymer-assisted sol-gel synthesis and characterization of Zn₂SiO₄:Eu³⁺ powders, *Journal of Alloys and Compounds*, (2009) 480 (2), 494-498
10. T. Damićanin; **I. Zeković**, B. Dimitrijevic, S. Ribar and M.D. Damićanin, Optical Biopsy Method for Breast Cancer Diagnosis Based on Artificial Neural Network Classification of Fluorescence Landscape Data, *Acta Physica Polonica A*, (2009) 5 (116), 690-692
11. R. Krsmanović, Ž. Andrić, M. Marinović-Cincović, **I. Zeković** and M.D. Damićanin, "Optical and Thermal Investigation of Sol-Gel Derived Eu³⁺:Y₂SiO₅ Nanoparticles", *Acta Physica Polonica A* No. 5,(2007) 112, 975-980

9. PRILOG

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani Ivana Zeković

broj indeksa AB060129

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

KOMPARATIVNA ANALIZA PIGMENTNIH LEZIJA I ZDRAVOG TKIVA KOŽE
OPTIČKIM SPEKTROSKOPSKIM METODAMA

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranta

U Beogradu, _____

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Ivana Zeković

Broj indeksa AB060129

Studijski program Animalna i humana fiziologija

Naslov rada KOMPARATIVNA ANALIZA PIGMENTNIH LEZIJA I ZDRAVOG TKIVA
KOŽE OPTIČKIM SPEKTROSKOPSKIM METODAMA

Mentor dr Tatjana Dramićanin

Potpisani Ivana Zeković

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada. Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranta

U Beogradu, _____

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

KOMPARATIVNA ANALIZA PIGMENTNIH LEZIJA I ZDRAVOG TKIVA KOŽE
OPTIČKIM SPEKTROSKOPSKIM METODAMA

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranta

U Beogradu, _____
